

**Klinische, biochemische und molekulargenetische  
Untersuchungen an Kindern mit Mitochondriopathien**

**H A B I L I T A T I O N S S C H R I F T**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae habilitatus

(Dr. med. habil)

im Fach Pädiatrie

eingereicht an der

Medizinischen Fakultät

Humboldt – Universität zu Berlin

von

Dr. med. Markus Schülke–Gerstenfeld

geboren am 05. Juli 1962 in Bleicherode (Harz)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Vorsitzender der Habilitationskommission:

Prof. Dr. Ulrich Frei

Gutachter:

1. Prof. Dr. Heinz Reichmann, Dresden
2. Prof. Dr. Thomas Meitinger, München

eingereicht am: 10. März 2001

Datum des Vortrags vor dem Fakultätsrat: 26. März 2002

# Abstract

Mitochondria have a crucial role in the energy metabolism of the cell, since they constitute the main place for ATP – production. Defects in the mitochondrial metabolism are associated with a wide spectrum of diseases. Due to their high energy demand brain and muscles are regularly affected (epilepsy, ataxia, myopathy). This work describes the cloning of nuclear encoded genes of complex I of the mitochondrial respiratory chain. The main interest is directed towards the 51 kDa subunit (NDUFV1) since, due to its NADH<sub>2</sub> – binding domain, it constitutes the entry port into complex I. Therein the first mutations are described, which lead to severe developmental delay, leukencephalopathy and muscular hypotonia in infants. Additionally patients with isolated complex III – deficiency are examined molecularly and are classified according to their clinical symptoms. In one patient isolated complex III deficiency and a mutation in the mitochondrial *cytochrome b* – gene are associated with septo – optic dysplasia. At the end problems with prenatal diagnosis of mitochondrial diseases and the peculiarities of genetic counselling of affected families are discussed.

## Keywords:

mitochondrion, prenatal diagnosis, complex I, complex III

# Zusammenfassung

Mitochondrien haben eine entscheidende Rolle im Zellmetabolismus, da sie den Hauptort der ATP – Produktion darstellen. Störungen des mitochondrialen Metabolismus sind mit einem weiten Spektrum von Erkrankungen assoziiert. Das Gehirn und die Muskulatur sind aufgrund ihres hohen Energiebedarfs dabei oft betroffen (Epilepsie, Ataxie, Myopathie). Diese Arbeit beschreibt die Klonierung von nukleären Genen des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die 51 kDa Untereinheit (NDUFV1) gerichtet, da sie mit ihrer Bindungsstelle für NADH<sub>2</sub> die Eintrittspforte in den Komplex I darstellt. In dieser Untereinheit werden die ersten Mutationen beschrieben, die bei Kindern zu schwerer Entwicklungsretardierung, Leukenzephalopathie und Muskelhypotonie führen. Im weiteren werden Patienten mit isoliertem Komplex III Mangel molekulargenetisch untersucht und klassifiziert. Bei einem Patienten war ein isolierter Komplex III – Mangel und eine Mutation im mitochondrialen *Cytochrom b* – Gen mit einer septo – optischen Dysplasie vergesellschaftet. Am Ende beschreibt die Arbeit die Probleme der pränatalen Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen und die Besonderheiten der genetischen Beratung betroffener Familien.

## **Schlagwörter:**

Mitochondrium, Pränataldiagnostik, Komplex I, Komplex III

# Vorwort

Mein Interesse an den mitochondrialen Erkrankungen wurde durch die Antrittsvorlesung von Frau PD Dr. Heidemarie Neitzel 1994 geweckt. Ihr damaliger Vortrag hatte den Titel „Was Mendel nicht wußte“ und handelte von den Besonderheiten der maternalen Vererbung mitochondrialer Erkrankungen. Einen weiteren Anstoß gaben Laurence D. Hurst und William D. Hamilton in ihrem Artikel „Cytoplasmatic fusion and the nature of sexes“ (*Proc R Soc Lond B* 1992; **247**, 189 – 194), die aufgrund theoretischer Überlegungen den Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Zweigeschlechtlichkeit höherer Lebewesen zuschrieben.

In der folgenden Zeit suchte ich unter den Patienten unserer neuropädiatrischen Abteilung nach Kindern mit Mitochondriopathien. Biochemische und genetische Untersuchungen führten zu ersten Kontakten mit dem Institut für Humangenetik (damals noch der Freien Universität Berlin). Mein Dank gilt hier Frau PD Dr. H. Neitzel und Herrn Prof. Dr. K. Sperling, die diese ersten wissenschaftlichen Schritte durch ihren Rat und technische Hilfe unterstützten.

Die Verwirklichung meiner wissenschaftlichen Pläne gelang jedoch erst mit Hilfe von Herrn Prof. Dr. C. Hübner, dem ich hier für seine fortdauernde tatkräftige Unterstützung und für die akademische Freiheit an seiner Abteilung besonders danken möchte. Ein Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schu 1187/1-1) ermöglichte mir von 1997 – 1999 einen zweijährigen Forschungsaufenthalt am Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders in den Niederlanden. Prof. Dr. F. Trijbels, Prof. Dr. J. Smeitink, Dr. W. Ruitenbeek, Dr. B. van den Heuvel und Dr. E. Mariman betreuten die Forschungsprojekte und die ersten Publikationen, wofür ich ihnen sehr danke. Mein herzlicher Dank gilt auch Antoon Janssen und Melan Bakker, meinen eigentlichen Lehrern am Labortisch.

Der Forschungskommission der Charité danke ich für die finanzielle und patentanwaltliche Hilfe bei der Patentanmeldung der Fluoreszenz – Genotypisierung und bei der Einrichtung eines eigenen Labors. Mein Dank gilt nicht zuletzt allen Patienten und



ihren Familien, die sich an den Forschungsprojekten beteiligten, und den zahlreichen deutschen und europäischen Kolleginnen und Kollegen, die mir Daten und Material ihrer Patienten zur Verfügung stellten.

Berlin, im März 2001

Dr. Markus Schülke – Gerstenfeld

# Abkürzungen und Datenbanken

**Gene** sind gemäß der internationalen Konvention **kursiv** und **Proteine nicht kursiv** gesetzt.

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| $\gamma$ GT | $\gamma$ -Gutamyl-Transferase        |
| ADP         | Adenosin-Diphosphat                  |
| ALAT        | Alanin-Amino-Transferase             |
| AP          | Alkalische Phosphatase               |
| ASAT        | Aspartat-Amino-Transferase           |
| ATP         | Adenosin-Triphosphat                 |
| BE          | base excess                          |
| bp          | Basenpaare                           |
| BZ          | Blutzucker                           |
| cAMP        | cyklisches Adenosinmonophosphat      |
| cDNA        | copy DNA                             |
| CK          | Kreatinkinase                        |
| CoQ         | Coenzym-Q, <i>Synonym:</i> Ubichinon |
| COX         | Cytochrom c Oxidase                  |
| CT          | Computertomographie                  |
| dB SPL      | decibel sound pressure level         |
| DCPIP       | Dichlorophenolindophenol             |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure               |
| dNTP        | Desoxyribonukleotide                 |
| EDTA        | Ethylendiaminoessigsäure             |
| EEG         | Elektroenzephalographie              |
| FAD         | Flavin-Adenin-Dinukleotid            |
| FeS         | Eisen-Schwefel-                      |
| FMN         | Flavin-Mononukleotid                 |

|                |  |
|----------------|--|
| g              | Erdbeschleunigung  |
| GCSF           | granulocyte colony stimulating factor  |
| GSP            | Genspezifischer Primer   |
| HPRT           | Hypoxanthin–Phosphoribosyl–Transferase   |
| ICSI           | Intracytoplasmatische Spermien–Injektion                                       |
| IFN $\gamma$   | Interferon– $\gamma$   |
| IP30           | interferon– $\gamma$ inducible protein 30 kDa precursor                        |
| kDa            | Kilodalton   |
| KSS            | Kearns–Sayre–Syndrom   |
| LDH            | Laktatdehydrogenase  |
| LHON           | Leber’s hereditäre Optikusneuropathie  |
| MALDI–TOF      | matrix assisted laser desorption/ ionization – time of flight                  |
| MELAS          | Metabolische Enzephalopathie, Laktatazidose,<br>Schlaganfall–ähnliche Episoden |
| MERRF          | Myoklonusepilepsie, ragged–red–fibers  |
| mRNA           | messenger RNA  |
| MRT            | Magnetresonanztomographie  |
| mtDNA          | mitochondriale DNA   |
| mtTFA          | mitochondrialer Transkriptionsfaktor A   |
| NAD            | Nikotin–Adenin–Dinukleotid   |
| NARP           | Neuropathie, Ataxie, Retinitis pigmentosa                                      |
| NDUFV1         | NADH:ubiquinone dehydrogenase<br>flavoprotein–fraction subunit 1               |
| NMD            | nonsense mediated messenger decay  |
| NRF            | nuclear respiratory factor   |
| nt             | Nukleotid  |
| OD             | optical density  |
| OMIM           | On–line Mendelian Inheritance in Man   |
| P <sub>i</sub> | anorganisches Phosphat   |
| PCR            | polymerase chain reaction  |
| PDH            | Pyruvatdehydrogenase   |
| PIRA           | primer induced restriction analysis  |
| RACE           | rapid amplification of cDNA ends   |

|              |  |
|--------------|--|
| RFLP         | Restriktionsfragment–Längenpolymorphismus                  |
| RNA          | Ribonukleinsäure   |
| <i>SCO2</i>  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> homologue of <i>COX</i>    |
| SDS–PAGE     | sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis |
| SSCP         | single stranded conformation polymorphism                  |
| <i>SURF1</i> | <i>SURFEIT I</i> (Assembly Gen von <i>COX</i> )            |
| tRNA         | transfer RNA   |
| UTR          | untranslatierte Region                                     |

## Datenbanken

|         |   |
|---------|---|
| MITOMAP | <a href="http://www.gen.emory.edu/mitomap.html">http://www.gen.emory.edu/mitomap.html</a>     |
| OMIM    | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/</a>             |
| BLAST   | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>           |
| NCBI    | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>                       |
| PUBMED  | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed/</a>         |
| GENBANK | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>       |
| PDB     | <a href="http://pdb.wehi.edu.au:8181/pdb/">http://pdb.wehi.edu.au:8181/pdb/</a>               |
| EXPASY  | <a href="http://www.expasy.ch/">http://www.expasy.ch/</a>                                     |
| UNIGENE | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/UniGene/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/UniGene/</a> |

# Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Vorwort</b>   | <b>III</b> |
| <b>Abkürzungen und Datenbanken</b>                                   | <b>V</b>   |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>   |
| <b>2 Grundlagen</b>  | <b>4</b>   |
| 2.1 Geschichte . . . . .   | 4          |
| 2.2 Aufbau und Funktion der Atmungskette . . . . .                   | 7          |
| 2.2.1 Struktur des Komplexes I . . . . .                             | 11         |
| 2.2.2 Struktur des Komplexes III . . . . .                           | 12         |
| 2.3 Vererbung mitochondrialer Erkrankungen . . . . .                 | 16         |
| 2.4 Häufige Mitochondriopathie – Syndrome . . . . .                  | 17         |
| 2.5 Genetische Beratung . . . . .                                    | 22         |
| <b>3 Ziele der Arbeit</b>  | <b>26</b>  |
| <b>4 Kasuistiken</b>   | <b>29</b>  |
| 4.1 Patienten mit Mutationen mitochondrial kodierter tRNAs . . . . . | 29         |
| 4.2 Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel . . . . .            | 31         |
| 4.3 Patienten mit isoliertem Komplex III – Mangel . . . . .          | 33         |
| <b>5 Material und Methoden</b>                                       | <b>39</b>  |
| 5.1 Messung der Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette . . . . .    | 39         |
| 5.1.1 Gewinnung und Vorbereitung des Materials . . . . .             | 39         |
| 5.1.2 Messung der Gesamtfunktion der Atmungskette . . . . .          | 40         |
| 5.1.3 Messung der Komplex I – Aktivitäten . . . . .                  | 41         |
| 5.1.4 Messung der Komplex II+III – Aktivitäten . . . . .             | 41         |
| 5.1.5 Messung der Komplex II – Aktivitäten . . . . .                 | 42         |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.1.6    | Messung der Komplex III – Aktivitäten . . . . .   | 42        |
| 5.1.7    | Messung der Komplex IV – Aktivitäten . . . . .  | 43        |
| 5.1.8    | Messung der Citratsynthase – Aktivitäten . . . . .  | 43        |
| 5.1.9    | Messung der Proteinkonzentrationen . . . . .  | 43        |
| 5.2      | Molekulargenetische Techniken . . . . .   | 44        |
| 5.2.1    | Klonierung der <i>NDUFVI</i> -cDNA . . . . .  | 44        |
| 5.2.2    | Klonierung der genomischen <i>NDUFVI</i> – DNA . . . . .  | 46        |
| 5.2.3    | Amplifikation der <i>NDUFVI</i> – Promotorregion. . . . .   | 46        |
| 5.2.4    | Primerset zum Mutationsscreening mitochondrialer tRNAs . .  | 47        |
| 5.2.5    | Sequenzierung der DNA . . . . .   | 48        |
| 5.2.6    | Haplotypanalyse mit Fluoreszenzmarkern . . . . .  | 49        |
| 5.3      | Quantitative Analyse der DNA . . . . .  | 52        |
| 5.3.1    | Gewebsverteilung der <i>NDUFVI</i> – mRNA . . . . .   | 52        |
| 5.3.2    | Quantifizierung der mutierten mitochondrialen DNA . . . . .   | 52        |
| 5.4      | Verbrauchsmittel und verwendete Software . . . . .  | 54        |
| <b>6</b> | <b>Ergebnisse und Diskussion</b>  | <b>55</b> |
| 6.1      | <b>Ergebnisse I:</b> Aufklärung der <i>NDUFVI</i> – Gensequenz . . . . .  | 55        |
| 6.1.1    | Die cDNA – Sequenz der <i>NDUFVI</i> – Untereinheit . . . . .   | 56        |
| 6.1.2    | Die genomische Sequenz der <i>NDUFVI</i> – Untereinheit . . . . .   | 59        |
| 6.1.3    | Bedeutung der Homologie zwischen den Genen <i>NDUFVI</i> und <i>IP30</i> . . . . .  | 62        |
| 6.1.4    | Mutationen im <i>NDUFVI</i> – Gen bei Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel . . . . .                               | 64        |
| 6.1.5    | Variabilität des klinischen Phänotyps bei Mutationen im Komplex I . . . . .   | 69        |
| 6.2      | <b>Ergebnisse II:</b> Patienten mit mitochondrialem Komplex III – Mangel  | 73        |
| 6.2.1    | Komplex III – Mangel: der klinische Phänotyp . . . . .  | 73        |
| 6.2.2    | Komplex III – Mangel: der biochemische Phänotyp . . . . .   | 75        |
| 6.2.3    | Komplex III – Mangel: der Genotyp . . . . .   | 79        |
| 6.2.4    | Besteht eine Genotyp – Phänotyp Relation? . . . . .   | 86        |
| 6.2.5    | Hypothesen zur Pathogenese der <i>Cytochrom b</i> – Mutationen .  | 87        |
| 6.2.6    | Septooptische Dysplasie und Komplex III – Mangel . . . . .  | 92        |
| 6.3      | <b>Ergebnisse III:</b> Mutationsscreening aller mitochondrialer tRNAs mittels eines neu entwickelten Primersets . . . . . | 96        |

|       |  |            |
|-------|--|------------|
| 6.4   | <b>Ergebnisse IV:</b> Genetische Beratungssituationen bei Familien mit mitochondrial und nukleär kodierten Atmungskettendefekten . . . . . | 99         |
| 6.4.1 | Familie A: die Unmöglichkeit einer pränatalen Abschätzung des Risikos aufgrund der Gewebsheteroplasmie der mtDNA Mutationen . . . . .      | 99         |
| 6.4.2 | Familie B: Fehler in der Pränataldiagnostik durch Zellkulturartefakte . . . . .  | 101        |
|       | <b>Zusammenfassung und Ausblick</b>  | <b>105</b> |
|       | <b>Literaturverzeichnis</b>  | <b>109</b> |

# Kapitel 1

## Einleitung

Mitochondriopathien sind ihrer Natur nach vielgestaltige Erkrankungen und beschäftigen viele medizinische Fachrichtungen wie Neurologie, Endokrinologie und Ophthalmologie. Bei den meisten Patienten steht die neurologische Symptomatik im Vordergrund. Sie umfasst Belastungsinsuffizienz der Muskulatur, Enzephalopathien mit schwer therapierbaren Epilepsien, dementieller Abbau, Seh – und Hörstörungen und Schlaganfall – ähnliche Episoden [166, 118, 119].

Eine bevölkerungsepidemiologische Studie zum Vorkommen von Mitochondriopathien in Mittelengland ergab eine Prävalenz rein mitochondrial kodierter Erkrankungen von 6,57 pro 100.000 Einwohner [33]. Damit haben diese eine höhere Prävalenz als die Duchenn'sche Muskeldystrophie (3,2 pro 100.000 Einwohner) und die myotone Dystrophie (5,0 pro 100.000 Einwohner) und liegen gleichauf mit der Chorea Huntington (6,4 pro 100.000 Einwohner) und der amyotrophen Lateralsklerose (6,2 pro 100.000 Einwohner). Nur ein Teil der Mitochondriopathien ist durch Mutationen in der mitochondrialen DNA verursacht [123], so daß sich die Prävalenz erheblich erhöht, wenn man auch nukleär kodierte mitochondriale Stoffwechseldefekte hinzurechnet. Eine bevölkerungsepidemiologische Studie hierzu wurde in Finnland durchgeführt. Bei Kindern lag die Gesamtprävalenz von Mitochondriopathien dort bei 17,4 pro 100.000 Einwohner [201].

Aufgrund ihrer Schlüsselstellung im aeroben Energiestoffwechsel der Zelle führt eine Störung der Mitochondrienfunktion meist zu einem klinischen Mischbild, bei dem insbesondere Gewebe mit hohem Energiebedarf betroffen sind. Dazu zählen:

- Gehirn (Epilepsie, Ataxie, mentale Retardierung, Schlaganfall-ähnliche Episoden)



- Muskulatur (Myopathie, Kardiomyopathie)
- Endokrine Organe (Hypothyreose, Hypoparathyreoidismus, Diabetes mellitus und/ oder insipidus)
- Sinnesorgane (Retinitis pigmentosa, Innenohrschwerhörigkeit)
- Nieren (Niereninsuffizienz, Fanconi – Syndrom)
- Darm (chronische Durchfälle)
- Pankreas (endokrine und exokrine Pankreasinsuffizienz)

Eine Vielzahl unterschiedlicher Enzymdefekte können eine Mitochondriopathie verursachen. Die meisten mitochondrialen Defekte betreffen die Atmungskette. In dieser werden energiereiche Substrate ( $\text{NADH}_2$ ,  $\text{FADH}_2$ ) aus dem Citratzyklus oxidiert und die freie Energie zur ATP – Bildung genutzt (oxidative Phosphorylierung). Eine Störung dieser Kopplung von Elektronentransport und ATP – Produktion beeinträchtigt den gesamten aeroben Stoffwechsel. Ein erhöhter ATP – Bedarf bei Streß, Belastung und Infektionskrankheiten kann gefährliche metabolische Dekompensationen auslösen, weil sich der erhöhte Energiebedarf nur durch Steigerung der anaeroben Glykolyse oder der Fettsäureoxidation decken läßt. Als Endprodukte dieser alternativen Stoffwechselwege fallen vermehrt Laktat und Ketonkörper an und führen zur metabolischen Azidose.

Im Kapitel 2 „Grundlagen“ wird nach einer kurzen historischen Übersicht eine Auswahl bisheriger Erkenntnisse über Struktur und Funktion des Mitochondriums und der Atmungskette dargelegt. Dabei werden die Atmungskettenkomplexe I und III besonders berücksichtigt, da sie den zentralen Anteil meiner Arbeit bilden. Anschließend werden die Besonderheiten der Vererbung mitochondrialer Erkrankungen und die Probleme der genetischen Beratung betroffener Familien erörtert.

Im Kapitel 3 werden die Ziele der Arbeit dargelegt und die Auswahl der Patienten und Methoden begründet.

Im Kapitel 4 „Kasuistiken“ werden die Anamnese, die klinischen Befunde und die apparativen Untersuchungsbefunde einiger ausgewählter Patienten vorgestellt, bei denen entweder neue Mutationen in den Atmungskettenkomplexen gefunden wurden oder die aufgrund anderer Aspekte von Interesse waren.

Im Kapitel 5 werden die in der Arbeit angewendeten biochemischen und molekulargenetischen Techniken beschrieben.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das Kapitel 6 in vier thematische Abschnitte gegliedert, in denen die jeweiligen Ergebnisse getrennt dargestellt und im Anschluß daran diskutiert werden. In den beiden ersten Abschnitten 6.1 und 6.2 werden die Untersuchungsergebnisse zu den Atmungskettenkomplexen I und III dargelegt und diskutiert. In Abschnitt 6.3 werden die Befunde des Mutationsscreenings bei mitochondrialen transfer – RNAs vorgestellt und diskutiert. Im letzten Abschnitt 6.4 werden die Schwierigkeiten der genetischen Beratung bei zwei ausgewählten Familien erörtert.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Geschichte

Die Verbesserung des Lichtmikroskops durch Ernst Abbe (1880) ermöglichte erstmals den Blick auf die Morphologie subzellulärer Bestandteile. Der Anatom Richard Altmann beschrieb 1890 solche „cytoplasmatischen Organellen“, welche er als „Elementarorganismen der Zelle“ bezeichnete [4]. Der Begriff „Mitochondrium“ wurde etwas später durch Benda (1897) geprägt und setzt sich aus den griechischen Wörtern für Faden ( $\mu\tau\acute{o}\varsigma$ ) und Korn ( $\chi\acute{o}\nu\delta\rho\omicron\varsigma$ ) zusammen [16]. Die Auflösungsverbesserung durch das Elektronenmikroskop ermöglichte weitere Einblicke in den Aufbau des Mitochondriums: 1953 beschrieb Palade die Doppelmembranstruktur und die Cristae im Inneren des Mitochondriums [147].

Als die biochemischen Reaktionswege des Citratzyklus (Krebs *et al.*, 1937) und der Fettsäureoxidation (Kennedy & Lehninger, 1949) in den Mitochondrien lokalisiert wurden, wurde deutlich, daß sie die aeroben Energieproduzenten der Zelle sind [113, 104]. Keilin & Hartee (1939) postulierten eine schrittweise Oxidation von  $\text{NADH}_2$  mit konsekutiver Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff [102]. Sie nannten dieses Modell die „Atmungskette“. Die freie Energie dieses schrittweisen Elektronentransfers wird benutzt, um Protonen gegen einen Gradienten aus der Mitochondrienmatrix in den intermembranösen Raum zu „pumpen“. Mitchell (1961) bewies, daß dieser Protonengradient die treibende Kraft der ATP – Synthese durch Komplex V (ATPase) ist [136]. Walker *et al.* (1995) gewannen durch Kristallisationsstudien an Komplex V grundlegende Erkenntnisse darüber, wie der Protonenrückstrom aus dem intermembranösen Spalt in die Mitochondrienmatrix mit der Reaktion  $\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{ATP}$  gekoppelt ist [210].

Lange Zeit glaubte man, die Mitochondrien seien von Zellkern unabhängige Organellen, doch die meisten mitochondrialen Enzyme werden im Cytosol synthetisiert und dann in das Mitochondrium importiert. Schleyer & Neupert (1985) entdeckten an der äußeren Mitochondrienmembran Kontaktstellen, über die der Transport der Polypeptide in die Mitochondrienmatrix stattfindet [165]. Der Importmechanismus von Polypeptiden durch die Mitochondriendoppelmembran ist ein unvollständig verstandener Prozeß, an dem zahlreiche Proteinkomplexe (Transmembran – Transportproteine) beteiligt sind. Die am endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Polypeptide haben in der Regel eine Zielsequenz (oder „Adresse“), die sie an Oberflächenrezeptoren der äußeren Mitochondrienmembran binden läßt. Im Anschluß daran werden die Polypeptide in einem energieverbrauchenden Prozeß in die Mitochondrienmatrix importiert. Dort wird die Zielsequenz durch Chaperonine entfernt und das Protein faltet sich spontan in seine dreidimensionale Gestalt [68]. Weitere sogenannte Assembly – Proteine sind am Zusammenbau der Einzelkomponenten zu den Multiproteinkomplexen der Atmungskette beteiligt [105], die zu den kompliziertesten aller bekannten biologischen Strukturen zählen.

Seit 1963 weiß man, daß das Mitochondrium ein eigenes Genom besitzt, welches manchmal als das „47. Chromosom“ bezeichnet wird [142]. Die mitochondriale DNA ist ein zirkuläres Molekül und im Gegensatz zur nukleären DNA nicht an Histone gebunden. Sie besteht aus 16.569 Basenpaaren und repräsentiert somit weniger als 0.0005% des gesamten menschlichen Genoms. Sie kodiert 22 mitochondriale tRNAs, 13 Strukturproteine der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V und die mitochondriale ribosomale RNA [6]. Alle anderen der mehr als 300 mitochondrialen Proteine werden aus dem Cytosol importiert. Die Untersuchung der mitochondrialen DNA hat inzwischen von der Molekulargenetik angeborener Stoffwechselerkrankungen über forensische Anwendungen bis zur Anthropologie ein weites Anwendungsfeld gefunden. So konnte die Abstammung des Menschen aus Afrika („Out of Africa“ – Theorie) durch Untersuchungen der mitochondrialen DNA erhärtet und ein „Stammbaum der Menschheitsgeschichte“ erstellt werden [206].

Die Koordination von Translation, Transport und Zusammenbau der Multiproteinkomplexe erfordert eine rege Interaktion zwischen Zellkern und Mitochondrium. Virbasius *et al.* (1994) konnten zeigen, daß das Zusammenspiel von Zellkern und Mitochondrium unter anderem durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, die sowohl in der nukleären DNA als auch in der mitochondrialen DNA Bindungsstellen aufweisen [207]. Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren wird in einen knockout – Mausmo-

dell deutlich, in welchem der mitochondriale Transkriptionsfaktor A inaktiviert wurde. Homozygote Embryonen starben in utero, da sie keine mitochondriale DNA aufwiesen. Bei heterozygoten Tieren fand man nur subtile biochemische Veränderungen und eine um 50% reduzierte Anzahl mitochondrialer DNA – Kopien [115].

In Anbetracht des Zusammenspiels von Transport – und Importmechanismen mit verschiedenen Stoffwechselfunktionen ist es nicht verwunderlich, daß die Störung dieser Prozesse zur Einschränkung der aeroben Energieproduktion und somit zu Multisystemerkrankungen führen kann. Dabei sind in der Regel Gewebe mit hohem Energieumsatz betroffen. 1959 beschrieben Ernester *et al.* erstmalig eine Patientin mit gesteigertem Grundumsatz, bei der sie eine Mitochondriopathie vermuteten [58]. Vier Jahre später wiesen Engel & Cunningham in der Muskelbiopsie dieser Frau abnorme Mitochondrien nach [55]. Die Mitochondrien stellten sich als Aggregate vergrößerter und geschwollener Einzelorganellen dar. In der modifizierten Gomori – Trichrom – Färbung fielen sie durch ihre rote Anfärbung auf, im Gegensatz zur Azurfarbe der normalen Muskelzellen (Abb. 2.1 Seite 7). Sie bezeichneten dieses Erscheinungsbild mit dem heute allgemein üblichen Begriff: „ragged – red – fibers“.

Der vermehrte Nachweis von ragged – red – fibers ist ein wichtiger Hinweis für das Vorliegen einer Mitochondriopathie, insbesondere für mitochondriale tRNA – Mutationen [44]. Vereinzelt wurden ragged – red – fibers auch bei Mutationen in mitochondrialen Strukturgenen gefunden, die für Proteinuntereinheiten der Atmungskettenkomplexe kodieren (z. B. im *Cytochrom b*-Gen) [100]. Bei der Mehrzahl der mitochondrialen Strukturgen – Mutationen werden jedoch keine ragged – red – fibers gefunden, so daß ihre Abwesenheit eine Mitochondriopathie nicht ausschließt [44].

Die genetische Ursache einer Mitochondriopathie wurde parallel von Lestienne & Ponsot (1988) und von Holt *et al.* (1988) bei Patienten mit Kearns – Sayre – Syndrom entdeckt [83, 120]. Sie fanden in der mitochondrialen DNA einiger dieser Patienten größere Deletionen von 3.000 bis 7.000 bp Länge. Goto *et al.* (1990) konnten bei Patienten mit MELAS – Syndrom eine Punktmutation in der mitochondrialen Sequenz für die tRNA – Leucin und Schoffner *et al.* (1990) beim MERRF – Syndrom eine Punktmutation in der tRNA – Lysin nachweisen [70, 174].

Kennzeichnend für krankheitsverursachende Mutationen der mitochondrialen DNA ist ihr heteroplasmisches Auftreten. Dies bedeutet, daß in einem Gewebe sowohl mutierte als auch Wildtyp – DNA – Moleküle vorliegen. Überschreitet der Heteroplasmiegrad eine Schwelle von 50 – 80% mutierter mitochondrialer DNA, wird der Defekt klinisch

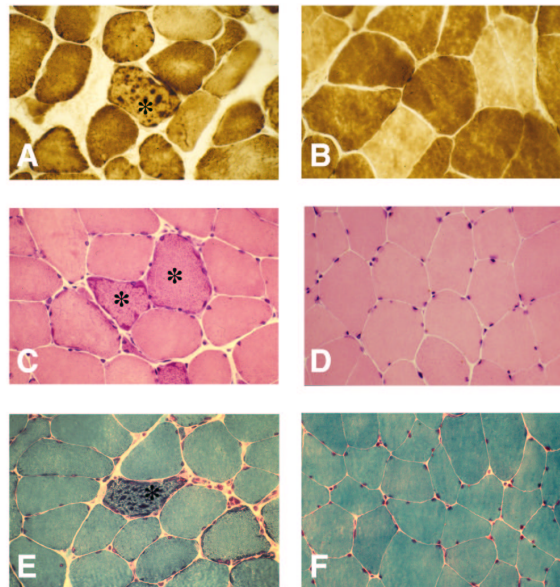


Abbildung 2.1: **Cytochrom c Oxidase (COX) – Färbung:** (A) *M. quadriceps* eines Patienten mit Mitochondriopathie. Die Faser mit den scholligen COX – Aggregaten (\*) entspricht einer pathologisch veränderten ragged – red – fiber. In (B) ist eine Normalkontrolle zum Vergleich dargestellt. **Hämatoxilin – Eosin-Färbung:** (C) Darstellung von ragged – red – fibers in der HE – Färbung (\*). (D) Normalkontrolle. **Gomori – Trichrom – Färbung:** (E) Darstellung einer ragged – red – fiber in der Gomori – Trichrom – Färbung (\*). Die subsarkolem-malen, rot angefärbten Aggregate entsprechen Ansammlungen pathologisch veränderter Mitochondrien. (F) Normalkontrolle. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Stoltenburg – Diding, Institut für Neuropathologie der Freien Universität Berlin.)

manifest. In der Regel geht ein hoher Heteroplasmiegrad mit einem schweren Krankheitsverlauf einher. Der Heteroplasmiegrad schwankt jedoch in unterschiedlichen Geweben und selbst in benachbarten Zellen [175] und bedingt die häufig unterschiedlichen Erstmanifestationssymptome selbst bei Patienten mit gleichem Genotyp [45]. Der Heteroplasmiegrad kann sich im Alter erhöhen [214]. Dies erklärt die Tendenz zur Progredienz der Erkrankung mit fortschreitendem Alter.

## 2.2 Aufbau und Funktion der Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung und die Photosynthese sind die wichtigsten biologischen Energieumwandlungsprozesse. Durch sie wird in der Natur die größte Menge des benötigten ATP produziert. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird die bei der Sauerstoffreduktion freiwerdende Energie zur ATP – Synthese genutzt. Diese chemischen Reaktionen spielen sich an der inneren Mitochondrienmembran zwischen Ma-

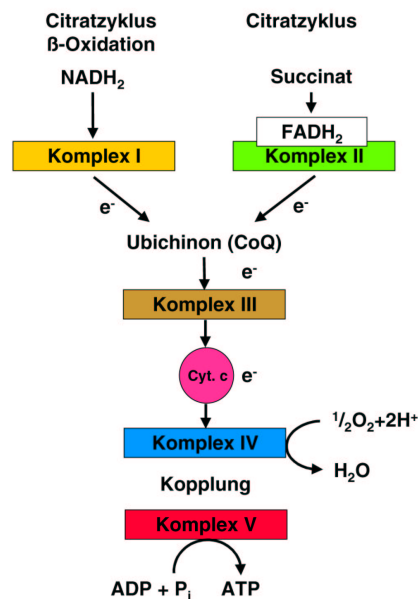
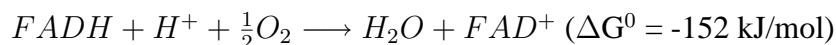
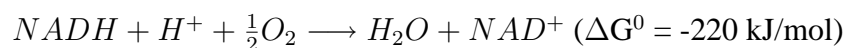


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des schrittweisen Elektronenflusses durch die Atmungskette. Eintrittspforten in die Atmungskette sind für das  $\text{NADH}_2$  der Komplex I und für das Succinat der Komplex II. Beide Substrate entstammen dem Citratzyklus.  $\text{NADH}_2$  fällt außerdem bei der  $\beta$ -Oxidation an. Das  $\text{FADH}_2$  ist als prosthetische Gruppe kovalent an den Komplex II gebunden. Die Komplexe I und II übertragen Elektronen auf Ubichinon. Ubichinon, als „frei bewegliche“ Komponente der Atmungskette, transportiert diese weiter zu Komplex III. Komplex III überträgt die Elektronen auf Cytochrom c, welches wiederum seine Elektronen über Komplex IV auf molekularen Sauerstoff überträgt. Die Bildung von ATP aus ADP und Phosphat erfolgt ausschließlich an Komplex V (ATPase). Dafür ist eine strukturelle/topische Kopplung von Elektronentransport und ATP-Synthese erforderlich, wie sie nur durch die intakte Doppelmembranstruktur des Mitochondriums gewährleistet ist.

trix und intermembranösem Raum ab. Die summarischen Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung, bei denen die energiereichen Substrate  $\text{NADH}_2$  (aus dem Citratzyklus und aus der  $\beta$ -Oxidation) und  $\text{FADH}_2$  (aus dem Citratzyklus) oxidiert werden, lauten:



Die hohe freiwerdende Energie ( $\Delta G^0$ ) dieser Reaktion kann im Mitochondrium nicht auf einmal in ATP fixiert werden, da die ATP-Synthese aus ADP und  $\text{P}_i$  nur 51,8 kJ/mol verbraucht. Die freie Energie der Gesamtreaktion wird daher in einer Kette von Teilreaktionen freigesetzt, so daß in jedem Schritt die freie Energie in einem hohen Wirkungsgrad in chemisch fixierte Energie (ATP) umgesetzt werden kann. Bei

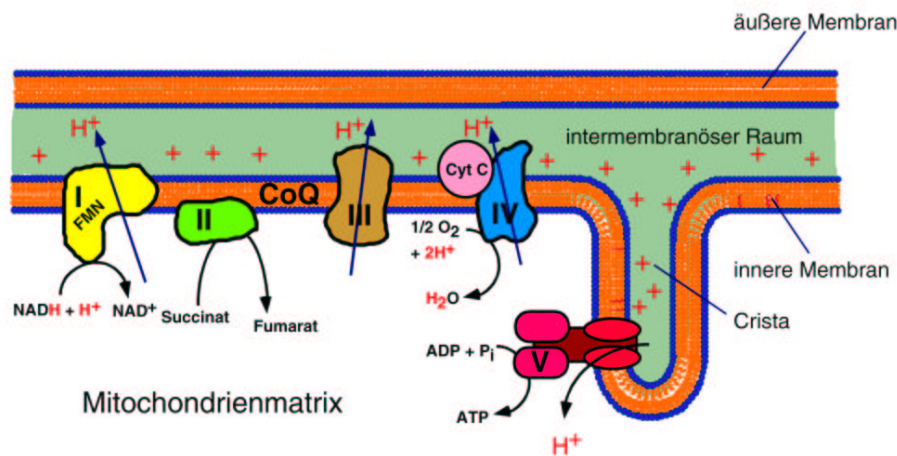
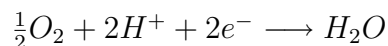


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Atmungskette. Alle Atmungskettenkomplexe befinden sich an der inneren Mitochondrienmembran. Der Elektronenfluß von Komplex I bis Komplex IV ist in Abb. 2.2 dargestellt. Der Protonenstrom durch die Komplexe I, III und IV ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Die erhöhte Protonenkonzentration im intermembranösen Spalt führt dort zu einer Ansammlung positiver Ladungsträger und zum Abfall des pH. Die Protonen strömen über den Komplex V (ATPase) zurück in die Mitochondrienmatrix. Die freie Energie dieses Rückstromes wird zur Synthese von ATP aus ADP + P<sub>i</sub> genutzt.

den Teilreaktionen fließen die Elektronen über mehrere in Reihe geschaltete Redoxzentren mit zunehmend positivem elektrochemischem Potential. Dieser Prozeß wird daher **Atmungskettenreaktion** genannt.

Am Ende steht die Reduktion molekularen Sauerstoffs:



Die Redoxzentren sind über die Atmungskettenkomplexe I bis IV verteilt. Sie sind in den Multiproteinkomplexen fest verankerte Eisen – Schwefel – Cluster und Häm – Gruppen. Dagegen funktionieren Ubichinon und Cytochrom c aufgrund ihrer freien Beweglichkeit in der Membran als „Elektronentransporter“ zwischen den Atmungskettenkomplexen. Die Atmungskettenkomplexe werden entsprechend ihrer biochemischen Funktion in der Elektronentransportkette nach ihrem Elektronendonator und Elektronenakzeptor benannt: **Komplex I:** NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (oxidiert NADH<sub>2</sub> und reduziert Ubichinon); **Komplex II:** Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase (oxidiert Succinat [via FADH<sub>2</sub>] und reduziert Ubichinon); **Komplex III:** Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (oxidiert Ubichinol und reduziert Cytochrom c); **Komplex IV:** Cytochrom c Oxidase (oxidiert Cytochrom c und reduziert molekularen Sauerstoff)

Es ist eine Besonderheit der Atmungskette, daß die Bildung von ATP nicht direkt an den für den Elektronentransport zuständigen Enzymkomplexen erfolgt, sondern über



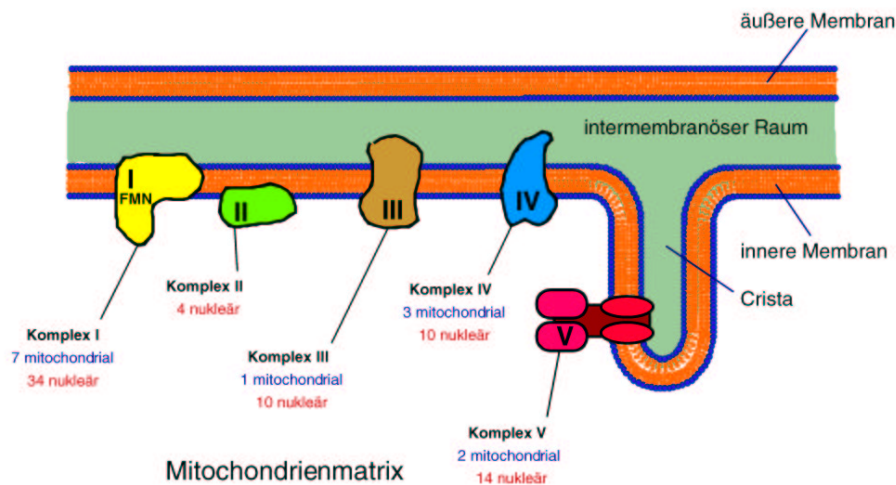


Abbildung 2.4: Zusammensetzung der Atmungskettenkomplex – Untereinheiten. Die **blaue** Zahl bezeichnet die Anzahl der mitochondrial kodierten, die **rote** Zahl die der nukleär kodierten Untereinheiten. Komplex I ist mit 42 Untereinheiten der größte, Komplex II mit 4 Untereinheiten der kleinste Atmungskettenkomplex. Komplex II ist der einzige Atmungskettenkomplex, der ausschließlich nukleär kodiert wird.

einen Umweg, der auch als **Kopplung** der oxidativen Phosphorylierung bezeichnet wird. Die Kopplung von Elektronentransport und ATP – Synthese setzt eine intakte mitochondriale Membranstruktur voraus (Abb. 2.3). Zerstört man diese Membranstruktur, können die einzelnen Atmungskettenkomplexe zwar noch Elektronen transportieren, die ATP – Bildung kommt jedoch zum Erliegen. In intakten Mitochondrien benutzen die Komplexe I, III und IV die freie Energie des Elektronentransports, um Protonen gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Mitochondrienmatrix in den intermembranösen Raum zu pumpen. Dort häufen sich Protonen an und führen zum Absinken des pH. Die angesammelten Protonen laufen entlang eines pH – Gradienten durch den Komplex V (ATPase) in die Mitochondrienmatrix zurück. In röntgen-diffraktometrischen Studien konnten Walker *et al.* (1995) zeigen, daß Komplex V die Form eines Pilzes mit Stiel und Kappe hat[210]. Die Kappe ragt in die Mitochondrienmatrix hinein. Durch den Protonenrückfluß wird der Stiel in Drehung versetzt, ähnlich dem Rotor eines Elektromotors [109]. Der Stiel ist etwas gebogen, so daß seine Rotation „mechanische“ Verformungen (Konformationsänderungen) der Molekülstruktur der Pilzkappe verursacht. Der ständige Wechsel zwischen zwischen 3 unterschiedlichen Konformationen bringt die Reaktionspartner ADP und  $P_i$  in eine günstige Lage zueinander, so daß sie an der Pilzkappe binden (Konformation 1), miteinander reagieren (Konformation 2) und wieder abdiffundieren (Konformation 3).

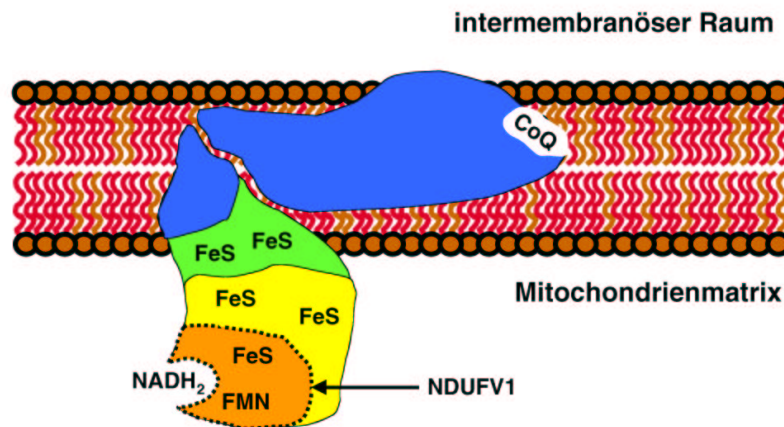


Abbildung 2.5: Räumliche Struktur des Atmungskettenkomplexes I, wie sie aus elektronenmikroskopischen und Fraktionierungsstudien abgeleitet wurde. Der Gesamtkomplex kann biochemisch in 3 Teilfraktionen zerlegt werden: eine Flavoprotein – (gelb), eine Eisen – Schwefelprotein – (grün) und eine hydrophobe Fraktion (blau). Die Proteine der hydrophoben Fraktion verankern den Komplex in der inneren Mitochondrienmembran und formen die Ubichinon(CoQ) – Bindungsstelle. Alle mitochondrial kodierten Komplex I – Untereinheiten befinden sich in der hydrophoben Fraktion. Die grün und gelb gezeichneten Anteile stellen das katalytische Zentrum des Komplexes dar und enthalten die Redoxzentren in Form von Eisen – Schwefel (FeS) – Clustern. Die in dieser Arbeit untersuchte NDUFV1 – Untereinheit des Komplexes I (**Punktlinie, orangener Anteil**) weist neben einem Eisen – Schwefel – Cluster auch die NADH<sub>2</sub> – Bindungsstelle auf und besitzt als prosthetische Gruppe das FMN, welches kovalent mit der Untereinheit verbunden ist. NDUFV1 bildet somit die „Eintrittspforte“ der Elektronen in die Atmungskette.

Da die vorliegende Arbeit insbesondere die Atmungskettenkomplexe I und III untersucht, wird die Ultrastruktur dieser beiden Komplexe genauer beschrieben.

### 2.2.1 Struktur des Komplexes I

Die genauesten Erkenntnisse über die Struktur des Komplexes I stammen aus Untersuchungen am Rind. Die Gruppe von Walker *et al.* (Nobelpreis für Chemie, 1997) identifizierte und sequenzierte alle bekannten Untereinheiten des bovinen Komplexes I und untersuchte den Gesamtkomplex hinsichtlich seiner Zusammensetzung [211, 60, 154, 62]. Aufgrund bisher unüberwindlicher technischer Probleme bei der Kristallisation des Gesamtkomplexes existieren keine hochauflösenden röntgendiffraktometrischen Daten zu seiner molekularen Struktur. \* Grigorieff (1998) konnte jedoch die äußere Struktur mittels elektronenmikroskopischer Techniken bis zu 22 Å auflösen [73]. Er beschrieb ein L – förmiges Gebilde, das an einen Stiefel erinnert. Der größte Teil des Komplexes liegt in der inneren Mitochondrienmembran und ein Arm ragt in die Mito-

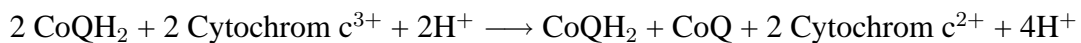
\*Unter „molekular“ ist hierbei eine Strukturauflösung von unter 3 Å zu verstehen.

chondrienmatrix hinein.

Der menschliche Komplex I besteht aus 41 Untereinheiten, von denen 7 mitochondrial und 34 nukleär kodiert sind (Tabelle 2.1). Der Gesamtkomplex mit einem Molekulargewicht von über 1.000 Kilodalton läßt sich biochemisch in 3 Unterfraktionen spalten [67]. Dies sind die Flavoprotein – Fraktion, die Eisen – Schwefelprotein – Fraktion und die hydrophobe Protein – Fraktion. Die beiden erstgenannten Fraktionen sind wasserlöslich, wohingegen die hydrophobe Fraktion, die alle mitochondrial kodierten Untereinheiten enthält, ein wasserunlösliches Aggregat bildet. Die Flavoprotein – und Eisen – Schwefelprotein – Fraktionen formen das aktive katalytische Zentrum und sind im peripheren Arm des Enzymkomplexes lokalisiert. Die aktiven Zentren werden von den Bindungsstellen für NADH<sub>2</sub> und FMN und von den Eisen – Schwefel – Clustern gebildet. Darüber hinaus existieren Untereinheiten (NDUFS4) die durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die Komplex I – Aktivität regulieren [164].

### 2.2.2 Struktur des Komplexes III

Im Vergleich zum Komplex I sind die Funktionsweise und molekulare Struktur des Komplexes III wesentlich besser verstanden. Sein Molekulargewicht beträgt 242 kDa. Der formale Name dieses Komplexes ist Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase. Die summarische Reaktion, die dieser Komplex katalysiert, lautet:



Ubichinol (Synonym: CoenzymQH<sub>2</sub>) wird zu Ubichinon (Synonym: CoenzymQ) reduziert, 2 Moleküle Cytochrom c werden reduziert und 2 Protonen werden in der Summe durch die innere Mitochondrienmembran in den intermembranösen Raum verlagert. Xia *et al.* (1997) konnten die molekulare Struktur des bovinen Komplexes III mittels röntgendiffraktometrischer Untersuchungen bis auf 3.0 Å auflösen [221].

Aufgrund der genau bekannten Abstände der Redoxzentren konnte der Weg der Elektronen und Protonen durch den Gesamtkomplex aufgeklärt werden. Cytochrom b enthält zwei Ubichinon – Bindungsorte. Aufgrund ihrer selektiven Hemmfähigkeit unterscheidet man eine Q<sub>0</sub> – Bindungsstelle (spezifische Hemmung durch Myxothiazol) und eine Q<sub>i</sub> – Bindungsstelle (spezifische Hemmung durch Antimycin A). Als Reaktionsmechanismus (Abb. 2.7) vermutet man, daß zunächst zwei Moleküle Ubichinol an der Q<sub>0</sub> – Stelle binden. Die Oxidation der zwei Ubichinole erfolgt nun bidirektional. Zunächst erfolgt die Übertragung von vier Elektronen auf das Eisen – Schwefel-Cluster im Rieske – Protein und von dort weiter auf das Cytochrom c. Gleichzeitig werden die vier

| Nukleär kodierte Komplex I – Untereinheiten |         |                                |                              |  |  |  |
|---|---------|--------------------------------|------------------------------|--|--|--|
| Gen – Name                                  | OMIM    | <i>E. coli</i><br>Äquivalent   | chromosomale<br>Lokalisation | Funktion   | Mutationen   |  |
| Flavoprotein – Fraktion                     |         |                                |                              |  |  |  |
| NDUFV1                                      | *161015 | <i>NuoF</i>                    | 11q13                        | NADH <sub>2</sub> – und<br>FMN – Bindungsstellen,<br>FeS – Cluster | Arg59Stop (diese Arbeit) [170]<br>Ala211Val (diese Arbeit)<br>Ala341Val (diese Arbeit) [170]<br>Thr423Met (diese Arbeit) [170] |  |
| NDUFV2                                      | *600532 | <i>NuoE</i>                    | 18p11.31 – p11.2             | FeS – Cluster, G – Protein   |  |  |
| NDUFV3                                      | *602184 |                                | 21q22.3                      |  |  |  |
| Eisen – Schwefelprotein – Fraktion          |         |                                |                              |  |  |  |
| NDUFS1                                      | *157655 | <i>NuoG</i>                    | 2q33 – q34                   | FeS – Cluster  | 5 bp Duplikation [204]<br>Trp96Stop [28]<br>Arg106Ter [28]   |  |
| NDUFS2                                      | *602985 | <i>NuoD</i>                    | 1q23                         | Regulation durch Phosphorylierung                                  |  |  |
| NDUFS3                                      | *603846 | <i>NuoC</i>                    | 11p11.11                     |  |  |  |
| NDUFS4                                      | *602694 |                                | 5q11.1                       |  |  |  |
| NDUFS5                                      | *603847 |                                | 1p34.2 – p33                 |  |  |  |
| NDUFS6                                      | *603848 |                                | 5pter-p15.33                 |  |  |  |
| NDUFA5                                      | *601677 |                                | 7q32                         |  |  |  |
| Hydrophobe Fraktion                         |         |                                |                              |  |  |  |
| NDUFA1                                      | *300078 | <i>NuoB</i><br><br><i>NuoI</i> | Xq24                         | FeS – Cluster (?)  |  | Val122Met [196]<br>Pro79Leu [126]<br>Arg102His [126] |
| NDUFA2                                      | *602137 |                                | 5q31.2                       |  |  |  |
| NDUFA3                                      | *603832 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFA4                                      | *603833 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFA6                                      | *602138 |                                | 22q13.1                      |  |  |  |
| NDUFA7                                      | *602139 |                                | 19p13.2                      |  |  |  |
| NDUFA8                                      | *603359 |                                | 9q33.2 – q34.11              |  |  |  |
| NDUFA9                                      | *603834 |                                | 12p                          |  |  |  |
| NDUFA10                                     | *603835 |                                | 12p                          | Acylcarrier  |  |  |
| NDUFAB1                                     | *603836 |                                | 16p12.3 – p12.1              |  |  |  |
| NDUFB1                                      | *603837 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB2                                      | *603838 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB3                                      | *603839 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB4                                      | *603840 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB5                                      | *603841 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB6                                      | *603322 |                                | –                            |  |  |  |
| NDUFB7                                      | *603842 |                                | 19p13.12 – p13.11            |  |  |  |
| NDUFB8                                      | *602140 |                                | 10q23.2 – q23.23             |  |  |  |
| NDUFB9                                      | *601445 |                                | 8q13.2                       |  |  |  |
| NDUFB10                                     | *603843 |                                | 16p13.3                      |  |  |  |
| NDUFS7                                      | *601828 |                                | 19p13                        | FeS – Cluster  |  |  |
| NDUFS8                                      | *602141 |                                | 11q13                        | FeS – Cluster  |  |  |
| NDUFC1                                      | *603844 |                                | 4q28.2 – q31.1               |  |  |  |
| NDUFC2                                      | *603845 |                                | – –                          |  |  |  |

Tabelle 2.1: Zuordnung der 34 nukleär kodierten Komplex I – Untereinheiten zu den 3 Fraktionen. Die Benennung der einzelnen Untereinheiten wurde vom Human Gene Mapping Nomenclature Committee festgelegt. Bisher wurden nur wenige pathogene Mutationen nachgewiesen. Das *NDUFV1* – Gen scheint einen Mutationsschwerpunkt darzustellen. Die klinischen Bilder der Patienten mit o.g. Mutationen sind auf den Seiten 31 und 69 beschrieben.

**Zusammensetzung des Komplexes III**

| Untereinheit                        | Molekulargewicht<br>[kDa] | Kodierung            |                |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------|
|                                     |                           | <i>mitochondrial</i> | <i>nukleär</i> |
| Core <sub>1</sub> Protein           | 49,1                      |                      | +              |
| Core <sub>2</sub> Protein           | 46,7                      |                      | +              |
| Cytochrom b                         | 42,5                      | +                    |                |
| Cytochrom c <sub>1</sub>            | 27,2                      |                      | +              |
| Rieske Eisen-Schwefel Protein       | 21,6                      |                      | +              |
| 13,4 kD Protein                     | 13,4                      |                      | +              |
| Q-bindendes Protein                 | 9,6                       |                      | +              |
| c <sub>1</sub> „hinge“ – Protein    | 9,2                       |                      | +              |
| 7,9 kDa Eisen – Schwefel Protein    | 7,9                       |                      | +              |
| c <sub>1</sub> assoziiertes Protein | 7,2                       |                      | +              |
| 6,4 kDa Protein                     | 6,4                       |                      | +              |
| <b>Prothetische Gruppen</b>         |                           |                      |                |
| Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub>      | 0,076                     |                      |                |
| Häm c <sub>1</sub>                  | 0,616                     |                      |                |
| Häm b <sub>H</sub>                  | 0,616                     |                      |                |
| Häm b <sub>L</sub>                  | 0,616                     |                      |                |

Tabelle 2.2: Untereinheiten des mitochondrialen Komplexes III. Nur eine Untereinheit des Gesamtkomplexes, das Cytochrom b wird durch die mitochondriale DNA kodiert. Die Hämgruppen sind im Cytochrom b und im Cytochrom c<sub>1</sub> lokalisiert. Die Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> – Cluster liegen im Rieske – Protein und im 7,9 kDa Eisen – Schwefel Protein.

freiwerdenden Protonen in den intermembranösen Spalt verlagert. Zurück bleiben zwei instabile Semichinone, welche je ein weiteres Elektron über 2 Häm – Gruppen an die Q<sub>i</sub> – Bindungsstelle weiterleiten und dabei zu Ubichinon oxidiert werden. An der Q<sub>i</sub> – Bindungsstelle wird durch diese beiden Elektronen ein Molekül Ubichinon zu Ubichinol reduziert, Die hierfür zusätzliche benötigten Protonen stammen aus der Mitochondrienmatrix. Aufgrund des partiellen Kreislaufes von Ubichinol wird diese Reaktion auch als „Q – Zyklus“ bezeichnet [136]. Eine pharmakologische Blockierung der Q<sub>i</sub> – Bindungsstelle mit Antimycin A führt zu einer massiven Radikalanflutung, da aufgrund eines „Staus“ die die Elektronen dort nicht mehr an Ubichinon abgegeben werden können, sondern durch Übertragung auf molekularen Sauerstoff freie Sauerstoffradikale bilden [21].

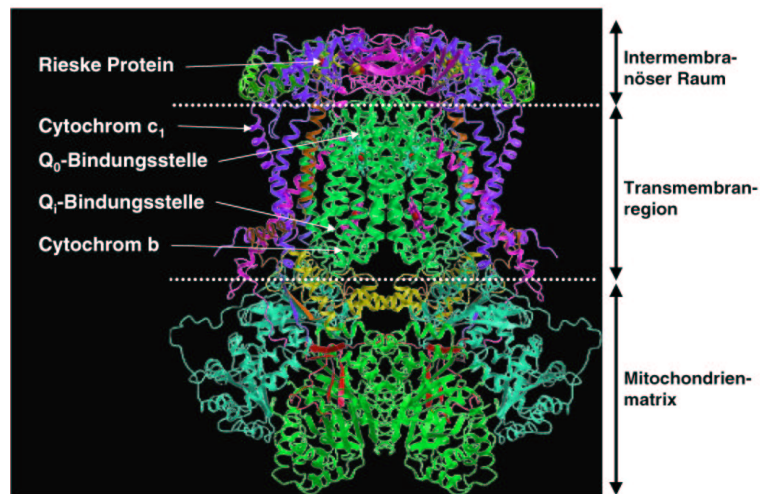


Abbildung 2.6: Die röntgendiffraktometrisch geklärte Struktur des bovinen Komplexes III nach Xia *et al.* (1997) (221). Die grün dargestellten  $\alpha$  – Helices in der Transmembranregion gehören zum Cytochrom b und verankern den Gesamtkomplex in der inneren Mitochondrienmembran. In den röntgendiffraktometrischen Untersuchungen der kristallinen Gesamtstruktur erscheint der Komplex als Dimer.

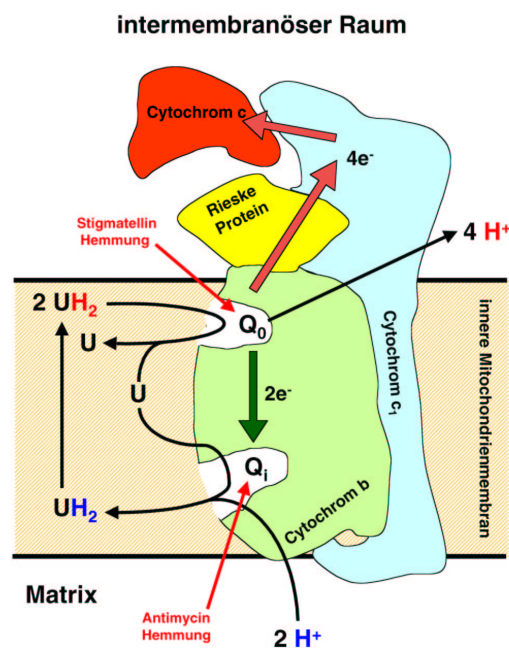


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Funktion des Komplexes III an der inneren Mitochondrienmembran (Q – Zyklus). Die primäre Bindung von Ubichinol ( $\text{UH}_2$ ) erfolgt an der  $\text{Q}_0$  – Bindungsstelle. Hier erfolgt die Oxidation zu Ubichinon (U). Zwei Drittel der bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden auf Cytochrom c übertragen und ein Drittel über 2 Häm – Gruppen an die  $\text{Q}_i$  – Bindungsstelle geleitet, an der ein Molekül Ubichinon (U) unter Anziehung zweier Protonen aus der Mitochondrienmatrix wieder zu Ubichinol ( $\text{UH}_2$ ) reduziert wird. Ein Teil der Ubichinol/on – Moleküle bewegt sich somit „im Kreis“.



## 2.3 Vererbung mitochondrialer Erkrankungen

Alle Mitochondrien werden maternal durch die Oozyte vererbt, die bis zu 100.000 mitochondriale DNA – Kopien in ca. 20.000 Mitochondrien enthält [153]. Die väterlichen Mitochondrien verbleiben nach Eindringen des Spermienkopfes außerhalb der Oozyte. Die Oozyte besitzt sogar einen Mechanismus, die väterlichen Mitochondrien aktiv zu eliminieren, falls sie wie bei der ICSI – Methode (intracytoplasmatic sperm injection) doch in das Cytoplasma der Oozyte gelangen [130, 84]. Weitere Studien zur Wechselwirkung von Mitochondrien unterschiedlicher Herkunft wurden an Dolly, dem ersten geklonten Schaf, durchgeführt [59, 220]. Bei der Klonierung wurde eine entkernte Oozyte (enthält ca. 20.000 Mitochondrien) mit einem somatischen Spend-erfibroblasten (enthält ca. 200 Mitochondrien) durch Elektroporation verschmolzen. In der Zygote vermischten sich folglich beide Mitochondrienpopulationen, von denen die Fibroblastenmitochondrien ca. 1% ausmachten. Bei der Untersuchung der mitochondrialen DNA im erwachsenen Schaf fanden sich jedoch trotz sehr empfindlicher Nachweismethoden keine Mitochondrien, welche dem Fibroblasten entstammten. Zwischen unterschiedlichen Mitochondrienpopulationen scheinen Ausleseprozesse stattzufinden, die dazu führen, daß eine Population vollständig verschwindet.

Diese experimentellen Daten belegen auf eindrucksvolle Weise die Hypothese von Hurst & Hamilton (1992), daß sich unter höheren Lebewesen die Zweigeschlechtlichkeit ausprägte, um einen „Konflikt“ der cytoplasmatisch vererbten Gene zu minimieren. Das Problem wurde dadurch „gelöst“, daß nur ein Geschlecht in der Lage war, seine cytoplasmatischen Gene weiterzuvererben. Das Aufkommen von Spermien, die nur kernkodierte Gene, jedoch so gut wie kein Cytoplasma tragen, war evolutionär die „logische Konsequenz“ [87].

Genetische Merkmale, die über die mitochondriale DNA vererbt werden, folgen daher einem rein maternalen Erbgang. Bei den Müttern von Patienten mit Mitochondriopathien weisen die Oozyten häufig eine Heteroplasmie auf, wobei der Grad der Heteroplasmie selbst in benachbarten Oozyten von 0 bis 100% schwanken kann (siehe Abschnitt 6.3). Eine zuverlässige genetische Beratung von Eltern mit einem betroffenen Kind ist daher kaum möglich. Dagegen folgen Mutationen in kernkodierten Genen einem Mendel'schen autosomal rezessiven Erbgang.

Genetische Ursachen einer Mitochondriopathie umfassen Mutationen von Strukturproteinen der Atmungskettenkomplexe oder der Pyruvatdehydrogenase, von mitochondrialen tRNAs, von Assemblyproteinen oder von Transmembran – Transportproteinen. Die folgende Aufstellung klassifiziert die Mitochondriopathien nach ihrem Ver-

erbungsmuster und Pathomechanismus:

1. Mutationen der mitochondrialen DNA (maternalen Erbgang):
  - 1.1 Deletionen der mitochondrialen DNA
  - 1.2 Mutationen mitochondrialer tRNAs
  - 1.3 Mutationen mitochondrial kodierter Atmungsketten – Strukturprotein – Gene
2. Mutationen der nukleären DNA (Mendel'scher Erbgang):
  - 2.1 Strukturproteine der Pyruvatdehydrogenase
  - 2.2 Enzyme des Citratzyklus
  - 2.3 Enzyme der  $\beta$  – Oxidation
  - 2.4 Strukturproteine der Atmungskettenkomplexe
    - 2.4a Komplex I – Untereinheiten
    - 2.4b Komplex II – Untereinheiten
  - 2.5 Assembly – Proteine
  - 2.6 Transportproteine
  - 2.7 mitochondrial assoziierte Proteine
    - 2.7a  $\text{Cu}^{2+}$  transportierende ATPase (Morbus Wilson)
    - 2.7b Frataxin (Friedreich Ataxie)
    - 2.7c Paraplegin (hereditäre Paraplegie)
  - 2.8 Mutationen in Genen von Proteinen, welche die nukleo – mitochondriale Interaktion bzw. die Integrität des mitochondrialen Genoms beeinflussen
    - 2.8a mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (mtTFA)
    - 2.8b Wolframin (Wolfram – Syndrom)
    - 2.8c Thymidinhydroxylase

## 2.4 Häufige Mitochondriopathie – Syndrome

Für Mitochondriopathien existieren keine klaren Genotyp – Phänotyp Beziehungen. Sehr unterschiedliche genetische Defekte können zu ähnlichen klinischen Bildern führen.



So kann ein Leigh – Syndrom sowohl durch eine Mutation in der mitochondrialen DNA (8993T→C/G [46])

als auch durch Mutationen in den nukleären Genen der Pyruvatdehydrogenase (z.B. der E2 $\alpha$  – Untereinheit [151]) oder des Komplexes I (z.B. der NDUF5 – Untereinheit [126]) verursacht werden. Im Gegensatz dazu kann die phänotypische Ausprägung der gleichen Mutation (z.B. in der mitochondrialen DNA: 3243A→G ) sehr unterschiedlich sein und von migräneartigen Kopfschmerzen bis zu schweren Schlaganfall – ähnlichen Episoden mit Diabetes mellitus und Epilepsie reichen.

Dennoch existieren einige für Mitochondriopathien „idealtypische Syndrome“. Es ist jedoch zu bedenken, daß aufgrund eines unterschiedlichen Heteroplasmiegrades ihre phänotypische Ausprägung sehr unterschiedlich sein kann.

### **Kearns – Sayre – Syndrom**

Das Kearns – Sayre – Syndrom (KSS, OMIM 530000) wurde 1958 erstmals beschrieben [99]. Diese Multisystemerkrankung manifestiert sich mit den Hauptsymptomen wie progressive externe Ophthalmoplegie, multiple Endokrinopathie, Retinitis pigmentosa, Kardiomyopathie und Liquoreiweißerhöhung. Daneben findet sieht man auch Symptome wie Muskelschwäche, Ataxie, Hirnnervenlähmungen und Kleinwuchs.

Lestienne & Ponsot (1988) beschrieben eine Deletion von 5.000 bp in der mitochondrialen DNA aus dem Muskel eines KSS – Patienten [120]. Die Mutation war in peripheren Leukozyten nicht nachweisbar. Holt *et al.* (1988) untersuchten weitere Patienten mit KSS oder mit isolierter Myopathie und fanden bei neun Patienten heteroplasmische Deletionen der mitochondrialen DNA unterschiedlicher Länge [83]. Das KSS beruht bei den meisten Patienten auf einer Spontanmutation und nur selten auf einem maternalen oder autosomal dominant oder rezessiv vererbten Gendefekt [18, 121]. Bei letzteren Erbgängen könnte es sich um Mutationen in kernkodierten Genen handeln, die das mitochondriale Genom vor Sauerstoffradikalen schützen oder auf andere Weise seine Integrität bewahren. Weiterhin ist nicht geklärt, weshalb die gleiche Deletion von 4.977 bp (die sogenannte „common deletion“, nt8470 – 13446) bei einem Patienten ein KSS, bei einem anderen jedoch ein Pearson – Syndrom (OMIM 557000) verursacht [63]. Dieses Syndrom ist durch eine therapieresistente sideroblastische Anämie und eine exokrine Pankreasdysfunktion gekennzeichnet und manifestiert sich in der Regel schon kurz nach der Geburt [152]. Im Gegensatz zum KSS lassen sich beim Pearson – Syndrom die Deletionen auch in der mitochondrialen DNA peripherer Blutzellen nachweisen [161]. Man kann daher vermuten, daß der Unterschied zwi-

schen KSS – und Pearson – Syndrom nur in der unterschiedlichen Gewebsverteilung liegt. Darüber hinaus sind Fälle beschrieben, bei denen die betroffenen Kinder anfänglich ein transfusionsbedürftiges Pearson – Syndrom hatten. Ab dem späten Kleinkindalter mußten diese Patienten dann nicht mehr transfundiert werden, entwickelten aber zunehmend ein KSS mit Ptosis, kardialen Reizleitungsstörungen und Myopathie [15, 178, 132].

### **Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie**

Die Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie (LHON, OMIM 535000) wurde von Theodor Leber 1871 erstmals beschrieben und bezeichnet ein familiär gehäuftes Syndrom mit in mittlerem Lebensalter plötzlich auftretendem, bilateralem Sehverlust mit Zentralskotomen beidseits[116]. Bei der ophthalmoskopischen Untersuchung findet man retinale Teleangiectasien, Mikroangiopathien und Papillenödeme. Weitere Symptome umfassen Herzreizleitungsstörungen, Ataxie, Spastik und eine sensorische Taubheit.

Der Vererbungsmodus ist in der Regel maternal. Genetische Ursachen der LHON sind Mutationen in den mitochondrial kodierten Strukturproteinen des Komplexes I (3460 G→A, 4160T→A, 11778G→A, 14484T→C, 14459G→A)[86, 85, 212, 94] Es besteht jedoch selbst bei Familienangehörigen mit ähnlichem Heteroplasmiegrad eine variable Penetranz der Symptomatik. Die Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie ist vor allem in Europa geschlechtswendig und betrifft vor allem das männliche Geschlecht. Dies führte zu der Hypothese, daß es sich dabei um eine Doppelmutation handeln könnte, wobei sich eine in der mitochondrialen DNA und die andere in der nukleären DNA des X – Chromosoms befindet [27].

### **MELAS – Syndrom**

Das Akronym MELAS (OMIM 540000) steht für **M**itochondriale **E**nzephalopathie, **L**aktatazidose und **S**chlaganfall ähnliche Episoden. Goto *et al.* (1990) wiesen bei MELAS – Patienten erstmals die 3243A→G Punktmutation in der tRNA – Leucin nach [143]. In der Folge wurden noch weitere Mutationen in der mitochondrialen DNA entdeckt, die mit dem MELAS – Phänotyp einhergehen (3271T→C, 3291T→C) [71, 72]. Während der Translation erniedrigt die in ihrer dreidimensionalen Struktur gestörte tRNA – Leucin die Syntheserate leucinreicher Proteine. Dies führt häufig zu einer kombinierten Störung der Atmungskettenkomplexe I und IV.

In Abhängigkeit vom Heteroplasmiegrad kann die Symptomatik von migräneartigen Kopfschmerzen und episodischem Erbrechen bis hin zum Vollbild mit Muskelschwäche, Ataxie, Hörverlust, Epilepsie, Demenz und Diabetes mellitus reichen. Die schlaganfallähnlichen Episoden mit Hemiparese, Gesichtsfeldausfällen und bulbären Störungen beruhen nicht auf einem Gefäßverschluß, sondern auf einer lokalen Gewebslaktatazidose mit konsekutiver Weitstellung der Hirnarterien [74, 34, 184]. Diese Episoden können durch Infekte, körperliche Belastung oder Medikamente ausgelöst werden. Im Gegensatz zum echten Schlaganfall sind die Symptome im Intervall in der Regel rückläufig. Das Manifestationsalter liegt zwischen 5 und 15 Jahren. Die Prognose wird im wesentlichen durch die Schwere der Epilepsie bestimmt.

### **MERRF – Syndrom**

Das Akronym MERRF (OMIM 545000) steht für **My**okonusepilpesie mit **Ragged – Red – Fibers**. Bei hohem Heteroplasmiegrad treten noch Muskelschwäche, Ataxie, spastische Paresen und Innenohrschwerhörigkeit hinzu. Die häufig therapieresistente Myoklonusepilpesie stellt ein therapeutisches Problem dar.

Die „ragged – red – fibers“ finden sich in der Gomori – Trichrom – Färbung und stellen degenerierte, mit geschwollenen Mitochondrien angefüllte Muskelfasern dar (siehe auch Abb. 2.1). Das MERRF – Syndrom wurde erstmals von Fukuhara *et al.* (1980) beschrieben [66]. Shoffner *et al.* (1990) wiesen bei MERRF – Patienten eine heteroplasmische Mutation (8344A→G) in der tRNA – Lysin nach [174]. Eine wesentlich seltenere Mutation (8356T→C)[176] geht ebenfalls mit einem MERRF – Syndrom einher.

Wie beim MELAS – Syndrom ist auch beim MERRF – Syndrom die Schwere des Krankheitsbildes vom Grad der Heteroplasmie abhängig. Biochemisch ist das MERRF – Syndrom durch einen kombinierten Mangel der Atmungskettenkomplexe I und IV gekennzeichnet. Eine Erklärung für die sich vom MELAS deutlich unterscheidende klinische Symptomatik bei ähnlichen biochemischen Befunden gibt es nicht. Als Grund wird eine mutationsspezifische Gewebsverteilung der pathologisch veränderten Mitochondrien diskutiert.

### **Leigh – Syndrom**

Dieses Syndrom wurde erstmals von Leigh (1951) bei einem wenige Wochen nach der Geburt verstorbenen Säugling beschrieben, der eine Degeneration der grauen Substanz

und Nekrosen in den Basalganglien und im Hirnstamm mit konsekutiver Kapillarproliferation aufwies [117].

Das klinische Bild des Leigh – Syndroms ist sehr heterogen und die Diagnose kann nur durch post mortem Untersuchung von Gehirngewebe anhand definierter neuropathologischer Kriterien gesichert werden [91]. Die Kombination von kernspintomographisch nachweisbaren bilateralen Striatumnekrosen und einer Liquorlaktaterhöhung legt die Diagnose jedoch nahe. Die Patienten fallen oft durch Ernährungsprobleme mit Dysphagie, Regurgitation, periodisches Erbrechen und Trinkschwäche auf. Epileptische Anfälle, Rigidität, motorische und geistige Entwicklungsverzögerung bzw. -regression können hinzukommen.

Die genetischen Ursachen des Leigh – Syndroms sind sehr heterogen. Es fällt jedoch auf, daß alle mitochondrialen Defekte, die zu einer schweren Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung führen, ein Leigh – Syndrom verursachen können [51]. Folgende biochemische Auffälligkeiten wurden in Zusammenhang mit einem Leigh – Syndrom beschrieben: (1) Pyruvatdehydrogenase – (PDH) – Mangel [160], (2) isolierter Komplex I – Mangel [155, 137] (siehe Abschnitt 6.1), (3) isolierter Komplex II – Mangel [20], (4) isolierter Komplex III – Mangel (siehe Abschnitt 6.2), (5) isolierter Komplex IV – Mangel [226] und (6) isolierter Komplex V – Mangel durch Mutationen in den mitochondrial kodierten Untereinheiten 4 und 6 der ATPase (8993T→C, 9176T→C) [46, 52].

## 2.5 Genetische Beratung und Pränataldiagnostik bei Mitochondriopathien

Es sei hier kurz an die Besonderheiten der Vererbung mitochondrialer Erkrankungen erinnert: (1) Mutationen der mitochondrialen DNA werden maternal durch die Oozyte vererbt. (2) Eine Eizelle enthält tausende Mitochondrien und eine entsprechende Anzahl von DNA – Kopien mitochondrialer Genome. (3) Mutationen können nur einen Teil der Mitochondrien einer Zelle betreffen und zur Koexistenz zweier oder mehrerer mitochondrialer Genotypen innerhalb der gleichen Zelle führen (Heteroplasmie), wobei der Prozentsatz mutierter Kopien oft die Schwere des Krankheitsbildes bestimmt [166]. (4) Die Mehrzahl mitochondrialer Proteine wird durch die nukleäre DNA kodiert, deren Vererbungsmodus den Mendel'schen Gesetzen folgt.

Eltern von Kindern mit Mitochondriopathien wünschen oft Auskunft über das mögliche Wiederholungsrisiko oder eine Pränataldiagnostik in folgenden Schwangerschaften. Die große Anzahl möglicher genetischer Defekte und die verschiedenen Vererbungsmodi machen es Ärzten und Genetikern schwer, verlässliche Prognosen zu erstellen. Nur dreizehn der insgesamt mehr als 300 mitochondrialen Proteine werden durch die mitochondriale DNA kodiert. Allein hier sind mehr als 100 Punktmutationen bekannt. Biochemische Messungen helfen zur Aufklärung des genetischen Defektes oft nicht weiter, da man häufig nur eine unspezifische Abnahme der oxidativen Phosphorylierung feststellt (z. B. bei kombinierten Atmungskettendefekten). In den meisten Fällen bleibt der genetische Defekt unerkannt. In einer großen Studie von 2000 Patienten mit Verdacht auf Mitochondriopathien konnten bei nur 44 Patienten Mutationen in der mitochondrialen DNA gefunden werden [123]. Eine Mutationssuche in den zahlreichen nukleären Genen erscheint aufgrund ihrer Anzahl noch problematischer. Eine genetische Beratung wird in Abhängigkeit der vorliegenden Befunde zu unterschiedlich präzisen Risikoabschätzungen führen. Im folgenden werden häufige Beratungssituationen aus dem klinischen Alltag getrennt nach Befundlage dargestellt:

**Fall A: Beim betroffenen Kind wurde eine Mutation in einer der nukleär kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe gefunden.**

*Genetische Beratung:* Wurde bei dem betroffenen Kind eine nukleäre Mutation gefunden, erfolgt die Beratung wie bei autosomal rezessiven (z. B. Mutationen in bisher

beschriebenen Strukturgenen des Komplexes I, oder Komplex IV – Assembly – Gene *SURF1* oder *SCO2*) bzw. X – chromosomal rezessiven Erkrankungen (z. B. Pyruvatdehydrogenase – Mangel mit mutierter  $E2\alpha$  – Untereinheit) .

*Pränataldiagnostik:* Diese gestaltet sich einfach, da die nukleär kodierten Mutationen in allen Körperzellen, also auch in Amnionzellen oder Chorionzotten nachweisbar sind. Nachdem der fetale Ursprung der Chorionzotten durch Mikrosatellitenanalyse gesichert wurde, genügt es, nach der spezifischen Mutation mittels RFLP oder direkter Sequenzierung zu suchen. Ein Beispiel hierfür ist in Abschnitt 6.4 dargestellt.

**Fall B: Beim betroffenen Kind konnte eine Mutation in der mitochondrialen DNA nachgewiesen werden.**

*Genetische Beratung:* Ist beim Indexpatienten eine heteroplasmische Mutation in der mitochondrialen DNA bekannt, sollte zunächst untersucht werden, ob sich diese Mutation auch bei der Mutter und anderen Geschwistern des Patienten nachweisen lässt. Wird die gleiche Mutation bei der Mutter gefunden, kann mit Ausnahme der 8993 →C/G – Mutation (siehe unten) das empirische Wiederholungsrisiko, wie in Abschnitt 6.3 an einem Beispiel demonstriert, nicht angegeben werden. Ist die Mutation bei der Mutter und den Geschwistern nicht nachweisbar, kann es sich um eine postmeiotische sporadische mitochondriale Mutation handeln (siehe *Cytochrom b* – Mutationen im Abschnitt 6.2). In einem solchen Falle scheint das Wiederholungsrisiko wesentlich geringer zu sein. Diese Aussage gibt jedoch nur einen Trend wieder, der sich aus wenigen Einzelfallbeschreibungen ergibt.

*Pränataldiagnostik:* Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung von Chorionzotten oder Amnionzellen helfen prognostisch nicht weiter. Selbst wenn eine Mutation gefunden wurde, bleibt es aufgrund der bekannten Gewebsheteroplasmie mitochondrialer Mutationen unklar, ob der in den Chorionzotten gefundene Heteroplasmiegrad für den Fetus repräsentativ ist.

Die einzige Ausnahme in der Unsicherheit pränataler Risikoabschätzung scheint die mitochondriale 8993T→C/G – Mutation zu sein. Sie betrifft ein Strukturgen der mitochondrialen ATPase und geht mit einem Morbus Leigh oder dem NARP – Syndrom einher. NARP ist ein Akronym für den Symptomenkomplex **N**europathie, **A**taxie, **R**etinitis **p**igmentosa. Die geringe Variation der Gewebsheteroplasmie dieser Mutation ermöglicht aus den Untersuchungen der Chorionzellen eine relativ genaue Vorhersage über

den Heteroplasmiegrad des Feten [217]. Darüber hinaus ist sogar eine vorsichtige Abschätzung des präkonzeptionellen Betroffenheitsrisikos des Feten möglich, wenn der Heteroplasmiegrad der Mutter bekannt ist [216]. Es ist immer zu bedenken, daß die 8993 T→C/G – Mutation in seltenen Fällen auch spontan auftreten kann [47, 186].

**Fall C: Beim betroffenen Kind wurde eine reduzierte Aktivität eines oder mehrerer Atmungskettenkomplexe biochemisch gemessen, eine Mutation konnte jedoch weder in der mitochondrialen noch in der nukleären DNA gefunden werden.**

*Genetische Beratung:* Dies ist der in der genetischen Beratungssituation weitaus häufigste Fall. Hierbei können zur Klärung des Vererbungsmodus nur anamnestische Daten oder Untersuchungen anderer Familienangehöriger herangezogen werden. Ergibt sich aufgrund der anamnestischen Angaben ein rein maternaler Erbgang, ist als Ursache der Erkrankung eine Mutation der mitochondrialen DNA am wahrscheinlichsten. Sind das Mutationsscreening der häufigsten Punktmutationen und das in dieser Arbeit beschriebene tRNA – Screening negativ, käme noch eine Sequenzanalyse des gesamten mitochondrialen Genoms in Frage, welche aber bei mehr als 16 Kilobasen sehr aufwendig ist.

Sind die Eltern blutsverwandt und wurde die Erkrankung des Indexpatienten sehr früh manifest, ist ein autosomal rezessiver oder X – chromosomal rezessiver Erbgang wahrscheinlicher [179].<sup>†</sup>

Insgesamt kann das Wiederholungsrisiko bei vermuteter mitochondrialer Mutation nicht angegeben werden. Bei einer vermuteten kernkodierten Mutation sollte die Beratung entlang der Richtlinien für autosomal rezessive Erkrankungen erfolgen. Allerdings sollte immer berücksichtigt werden, daß aufgrund ungenauer familienanamnestischer Angaben der Vererbungsmodus falsch eingeschätzt werden kann.

*Pränataldiagnostik:* Die Entscheidungen können in diesem Fall allein auf den biochemischen Meßergebnissen des fetalen Gewebes basieren:

Da die biochemische Ausprägung eines Atmungskettendefektes zwischen unterschiedlichen Geweben variieren kann, versucht man die diagnostische Sicherheit zu verbessern, indem man nur dann eine pränatale Diagnostik anbietet, wenn sich der biochemische Defekt in mindestens zwei unterschiedlichen Geweben des Indexpatienten bestätigen läßt (im Muskelgewebe *und* in Fibroblasten) [162]. Die Messung der

---

<sup>†</sup>Eine Besonderheit stellt der isolierte Komplex II – Mangel dar. Da seine vier Untereinheiten alle kernkodiert sind, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit ein autosomal rezessiver Erbgang vor.

Atmungskettenenzym – Aktivitäten wird in der Regel in einer Chorionzottenbiopsie durchgeführt, die um die 12. Schwangerschaftswoche entnommen wird. Um die diagnostische Sicherheit noch weiter zu erhöhen, sollten die Atmungsketten – Aktivitäten sowohl in den nativen als auch in den gezüchteten Chorionzotten bestimmt werden. Diese Notwendigkeit wurde uns bewußt, nachdem uns ein Fall bekannt wurde (unpublizierte Daten), bei dem die Komplex I – Aktivitäten in den nativen Chorionzotten normal, in den gezüchteten jedoch pathologisch erniedrigt waren. Der Patient war betroffen und verstarb im Alter von 18 Monaten an einer Laktatazidose und hypertrophen Kardiomyopathie.

Es ist bei allen biochemischen Untersuchungen erforderlich, die fetale Herkunft der nativen und gezüchteten Chorionzellen mittels molekulargenetischer Methoden zu sichern. Diese zusätzliche Empfehlung beruht auf dem in Abschnitt 6.4 genauer besprochenen Fall, in dem wenige verunreinigende mütterliche Zellen aus der Chorionzottenbiopsie nach wenigen Passagen die Zellkultur dominierten.



# Kapitel 3

## Ziele der vorliegenden Arbeit

Mitochondriopathien stellen keine genetisch einheitliche Krankheitsgruppe dar, sondern sind unterschiedliche Krankheitsentitäten, deren einzige Gemeinsamkeit oft nur in einer erniedrigten ATP – Produktion besteht. Der Energiemangel ist der Grund für eine Überschneidung der klinischen Symptomatik trotz heterogener genetischer Defekte.

Die klinische und genetische Heterogenität erschwert die Lokalisation des Gendefektes. Diese Schwierigkeit besteht selbst dann fort, wenn eine Störung der Atmungskette, bzw. der Pyruvatdehydrogenase biochemisch gesichert wurde.

Bei Beginn der Arbeit war nur ein einziger nukleärer Gendefekt bekannt, der zu einer Störung der Atmungskettenfunktion führte [20]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Gendefekte zu entdecken, die eine Mitochondriopathie verursachen können. Patienten mit diesen neuen Gendefekten sollten dann klinisch evaluiert werden, um herauszufinden ob „weniger bedeutsame“ Nebensymptome jenseits der durch den allgemeinen ATP – Mangel ausgelösten Hauptsymptome eine Abgrenzung eines spezifischen klinischen Phänotyps erlauben. Diese Information wäre für eine gezielte Mutationssuche von Bedeutung.

Um die Chancen zu erhöhen, neue Gendefekte zu finden, habe ich mich auf drei klinisch bzw. biochemisch definierte Patientengruppen beschränkt:

**Patienten mit isoliertem biochemischen Komplex I – Mangel:** Der isolierte Komplex I – Mangel ist der bei Mitochondriopathien am häufigsten nachgewiesene biochemische Defekt [179]. Der Vererbungsmodus legt bei den meisten Patienten einen autosomal rezessiven Erbgang nahe. Zu Beginn der Arbeit waren jedoch noch keine nukleär kodierten Gendefekte bekannt, die zu einem isolierten Komplex I – Mangel führen. Es war zu vermuten, daß Patienten mit isoliertem

Komplex I – Mangel einen genetischen Defekt in einer der strukturellen Untereinheiten dieses Komplexes aufweisen. Um diese Untereinheiten auf Mutationen untersuchen zu können, mußte erst die cDNA – bzw. die genomische Sequenz aller humanen 34 nukleär kodierten Proteinuntereinheiten geklärt werden. An diesem umfangreichen Projekt, welches am „Nijmegen Center for Mitochondrial Diseases“ durchgeführt wurde, beteiligte ich mich im Rahmen eines DFG – Forschungsstipendiums. Mein Teilziel war es, die funktionell wichtige, aber bislang bei Menschen noch nicht charakterisierte, NADH – bindende NDUFV1 – Untereinheit zu klonieren (*siehe Abschnitt 6.1*) und 30 Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel auf Mutationen in dieser Untereinheit zu untersuchen (*siehe Abschnitt 6.1.4*).

**Patienten mit isoliertem biochemischen Komplex III – Mangel:** Der isolierte Komplex III – Mangel ist im Vergleich zum isolierten Komplex I – oder IV – Mangel selten. Da Komplex III sowohl nukleär (10 Untereinheiten) als auch mitochondrial (1 Untereinheit) kodiert ist, können Mutation in beiden Genomen einen isolierten Mangel verursachen. Der funktionell wichtigste Teil des Gesamtkomplexes ist das Cytochrom b, welches durch die mitochondriale DNA kodiert ist. Ziel der Arbeit war es, Patienten mit isoliertem Komplex III – Mangel klinisch und biochemisch zu charakterisieren und auf Mutationen bzw. Sequenzvarianten im mitochondrial kodierten *Cytochrom b* – Gen zu untersuchen (*siehe Abschnitt 6.2*).

**Patienten, deren Vererbungsmuster einen maternalen Erbgang aufwies:** Die meisten durch die mitochondriale DNA vererbten Erkrankungen sind durch Mutationen in den mitochondrialen tRNAs bedingt. Ziel war es, einen Multiplex – Assay zu entwickeln, mit dem alle 22 mitochondrialen tRNAs durch direkte Sequenzierung mit vertretbarem Aufwand und kostengünstig analysiert werden können, um alle in Frage kommenden Patienten damit zu untersuchen zu können (*siehe Abschnitt 6.3*). Zur Einsparung von Forschungsgeldern habe ich eine Methode entwickelt, welche Genotypisierungen mit Fluoreszenzmarkern zu einem Bruchteil der bisher üblichen Kosten erlaubt (*siehe Abschnitt 5.2.6*) und beim Deutschen Patentamt in München zum Patent angemeldet wurde [168].

Die Möglichkeiten einer Gentherapie bei mitochondrialen Erkrankungen liegen in weiter Ferne. Gegenwärtig können wir unseren Patienten und ihren Familien nur eine adäquate Diagnostik und eine möglichst präzise genetische Beratung anbieten. Angesichts der komplizierten Vererbungsverhältnisse der mitochondrialen Erkrankungen

ist dies nicht einfach. Die Arbeit beinhaltet deshalb auch Empfehlungen zur pränatalen Diagnostik mitochondrialer Erkrankungen. Diese sind Resultat der Erfahrungen, die während der hier dargestellten Untersuchungen gewonnen wurden (*siehe Abschnitt 6.4*).

# Kapitel 4

## Kasuistiken

### 4.1 Patienten mit Mutationen mitochondrial kodierter tRNAs

#### Familie A

**Indexpatientin A.II:2** Die Patientin wurde als erstes Kind nicht blutsverwandter Eltern geboren (Stammbaum in Abb. 6.17, S. 96). Die frühkindliche Entwicklung verlief normal. Ab dem Alter von 8 Jahren bemerkten die Eltern zunehmende Lernschwierigkeiten ihrer Tochter. Um die gleiche Zeit wurde deren Gang ataktisch und sie klagte schon nach geringen körperlichen Belastungen über rasche Erschöpfung. Erste Myoklonien begannen um das 12. Lebensjahr und entwickelten sich über die folgenden 2 Jahre zu einer schwer therapierbaren Myoklonusepilepsie. Im EEG sah man eine Verlangsamung der Hintergrundaktivität, multifokale Spikes, Spikewaves und einen Photomyoklonus. Unter einer Therapie mit Valproat sistierten die Anfälle, aber ein rascher Lebertransaminasenanstieg zwang zum Therapieabbruch. Mit einer Kombination aus Ethosuximid und Lamotrigin konnten die generalisierten Anfälle unterdrückt werden, die Myoklonien bestanden aber weiter fort. Ein langsamer Hörverlust (50 dB SPL im Alter von 13 Jahren) erforderte die Anpassung von Hörgeräten. Seit der Pubertät wurde das Mädchen von schweren, langdauernden migränoiden Kopfschmerzen gequält, die weder auf eine Schmerztherapie noch auf Propanolol ansprachen und den Schulbesuch stark beeinträchtigten. Eine Kernspintomographie des Gehirns war zu diesem Zeitpunkt normal. Im Alter von 13 Jahren wurde eine Ergometrie durchgeführt: es kam zu einem raschen Laktatanstieg mit Azidose (pH 7,23; Laktat 10,8 mmol/L [Normwert: 0,5 – 2,2]; Pyruvat 0,28  $\mu$ mol/L [Normwert: <0,08]). Die Untersuchung einer

Muskelbiopsie ergab sowohl immunhistologisch als auch biochemisch den Befund eines Cytochrom c Oxidase – Mangels. Im Alter von 16 Jahren kam es nach einer eintägigen Aura, bei der das Mädchen über linksseitige Farbwahrnehmungen klagte, zu einer Epilepsia partialis continua mit kontinuierlicher Zuckung der linken Hand und des linken Fußes. Darüber hinaus bestand eine schwere Laktatazidose (pH 7,05; Laktat 17,6 mmol/L [Normwert: 0,5 – 2,2]). Auf einer zu diesem Zeitpunkt angefertigten Kernspintomographie des Schädels sah man in der T<sub>2</sub> – Wichtung im rechten Okzipitallappen eine ausgeprägte Signalintensität (Abb. 4.1A). Die Magnetresonanztomographie wies auf eine deutlich erhöhte Blutflußgeschwindigkeit und vergrößerte Gefäßkaliber in dieser Hirnregion hin (Abb. 4.1B). Im EEG sah man kontinuierliche rechtsseitige Spike – wave – Entladungen und eine schwere Allgemeinveränderung. Trotz Ausgleich der metabolischen Azidose und intravenöser Phenytoingaben sistierte die Epilepsia partialis continua nicht. Nach 14 Tagen fand man in der Kernspin – Kontrolltomographie eine deutliche Ausbreitung der T<sub>2</sub> – Signalintensitäten über die gesamte Hemisphäre. Mit zunehmender Häufigkeit ging die Epilepsia partialis continua in einen generalisierten, therapieresistenten Status epilepticus über, in dem die

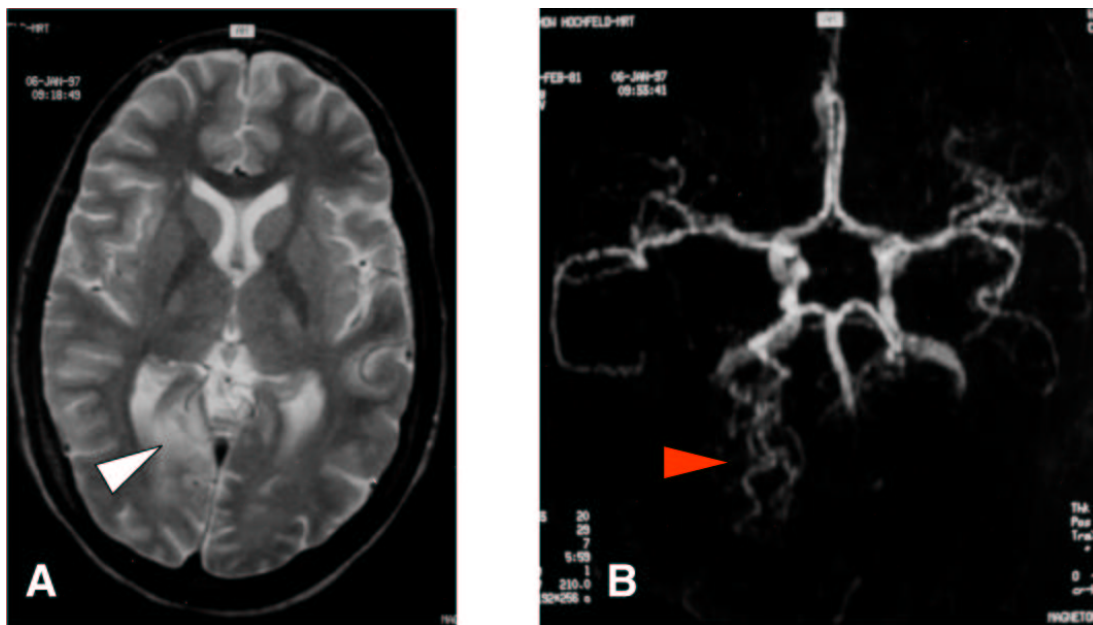


Abbildung 4.1: (A) T<sub>2</sub> – gewichtetes (TR = 2500 ms; TE = 80 ms) Kernspintomogramm der Patientin A.II:2 unmittelbar nach Beginn der Epilepsia partialis continua. Im rechten Okzipitallappen (weißer Pfeil) erkennt man einen Bezirk erhöhter T<sub>2</sub> – Signalintensität. Einen Tag vor dieser Aufnahme hatte die Patientin über eine Aura mit Farbwahrnehmungen im linken Gesichtsfeld geklagt. (B) Die pathologische T<sub>2</sub> – Signalerhöhung entspricht kernspinangiographisch einem Bezirk erhöhter Blutflußgeschwindigkeit in der rechten A. cerebri posterior (roter Pfeil).

Patientin 3 Monate nach stationärer Aufnahme verstarb.

**Halbschwester (über die Mutter) A.II:1** Das 17 – jährige Mädchen ist gesund und normal intelligent. Es liegen weder anamnestisch noch klinisch Anhaltspunkte für eine Mitochondriopathie vor.

**Mutter A.I:2** Die Mutter der Indexpatientin leidet an rezidivierenden Migräneschüben. Neurologische oder kognitive Auffälligkeiten fanden sich weder anamnestisch noch bei der klinischen Untersuchung.

## 4.2 Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel

### Familie B

**Indexpatientin B.II:1** Das Mädchen war das erste Kind gesunder, blutsverwandter Eltern (Cousin und Cousine ersten Grades) und wurde in der 41. Schwangerschaftswoche geboren (Stammbaum in Abb. 6.8, S. 65). Die Schwangerschaft war durch eine Präeklampsie erschwert. Unmittelbar postnatal fielen eine muskuläre Hypotonie, Akrozyanose und ein Pendelnystagmus auf. Die Analyse der organischen Säuren im Plasma ergab eine schwere Laktatazidose (pH 7,19) mit folgenden Werten: Laktat 24,1 mmol/L [Normwert: 0,5 – 2,2]; Pyruvat 0,02 mmol/L [Normwert: <0,08], Alanin 893  $\mu$ mol/L [Normwert: 40 – 500], Urin  $\alpha$  – Ketoglutarat 1852 mmol/ mol Kreatinin [Normwert: 159  $\pm$  137]; Urin Laktat 1713 mmol/mol Kreatinin [Normwert: 234 $\pm$ 164]. Die im Liquor gemessene Laktatkonzentration war mit 9,6 mmol/L ebenfalls stark erhöht [Normwert: <2]. Bildgebende Verfahren wie Schädelsonographie und eine kranielle Kernspintomographie waren unauffällig. In der Muskelhistologie fanden sich starke intrazelluläre Glykogenanhäufungen. Die biochemische Untersuchung ergab einen isolierten Atmungskettenkomplex I – Mangel in der Muskulatur (Tabelle 6.9 auf Seite 102). Das Kind verstarb im Alter von vier Wochen an einer Ateminsuffizienz im Rahmen einer nicht therapierbaren metabolischen Entgleisung.

**Zweite Schwangerschaft B.II:2** In der 11. Schwangerschaftswoche wurde eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt. Sowohl im nativen Biopsat als auch in der daraus gewonnenen Zellkultur wurden die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe bestimmt. In den nativen Chorionzotten waren die Befunde normal, in den gezüchteten Chorionzotten fand sich jedoch ein isolierter Komplex I – Mangel. Da die Eltern hinsichtlich dieser uneindeutigen Befunde auf der „sicheren Seite“ sein wollten, wurde die Schwangerschaft abgebrochen. Die Untersuchung der Atmungskettenenzym – Aktivitäten im

Muskel des abortierten Feten ergab einen Normalbefund. Die Diskrepanz zwischen den Befunden der nativen und der gezüchteten Chorionzotten wird in Abschnitt 6.4 diskutiert.

**Patient B.II:3** Bei der pränatalen Diagnostik per Chorionzottenbiopsie in der 11. Schwangerschaftswoche fand sich weder in den nativen noch in den gezüchteten Chorionzotten ein Atmungskettenkomplex – Mangel. Ein gesunder Junge wurde zum Termin geboren und zeigte bis zum Alter von 10 Monaten keine Symptome einer Mitochondriopathie. Der Serum – Laktatwert des Kindes war normal.

## Familie C

**Indexpatienten C.II:1 und C.II:2** Beide Eltern waren gesund und nicht blutsverwandt. Der klinische Verlauf der beiden Brüder war hinsichtlich Symptomatik und biochemischer Befunde sehr ähnlich. Schwangerschaft und Geburt waren unauffällig. Das Geburtsgewicht war normal. Im Alter von 5 Monaten kam es bei beiden Kindern zu wiederholten Episoden starken Erbrechens. In den folgenden Wochen zeigten die Kinder eine psychomotorische Regression begleitet von schwerer muskulärer Hypotonie, Myoklonusepilepsie und Strabismus convergens. Im Computertomogramm des Schädels sah man eine Hirnatrophie mit deutlicher *e vacuo* Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume. Laktat – und Pyruvatkonzentrationen im Plasma und Liquor waren erhöht. Bei der biochemischen Analyse der Atmungskettenkomplex – Aktivitäten fand sich ein isolierter Komplex I – Mangel. Beide Kinder starben im Alter von 14 und 17 Monaten an einer Ateminsuffizienz im Rahmen einer schweren Pneumonie.

## Familie D

**Indexpatientin D.II:1** Das Mädchen ist das erste Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern (Stammbaum in Abb. 6.10, S. 68). Schwangerschaft und Geburt waren normal. Im Alter von 6 Monaten wurde erstmals eine Myoklonusepilepsie beobachtet. Eine zunächst stark ausgeprägte Muskelhypotonie ging in eine Spastik über. Ab dem Alter von 12 Monaten entwickelte sich das Kind psychomotorisch nicht weiter. Wiederholte MRT – Untersuchungen zeigten eine progrediente Hirnatrophie und eine makrozystische Leukodystrophie (Abb. 4.2).

Der klinische Phänotyp der Patientin (Makrozephalus, Leukodystrophie, psychomotorische Regression) entsprach einem *Morbus Alexander* (OMIM 203450). Pathogno-

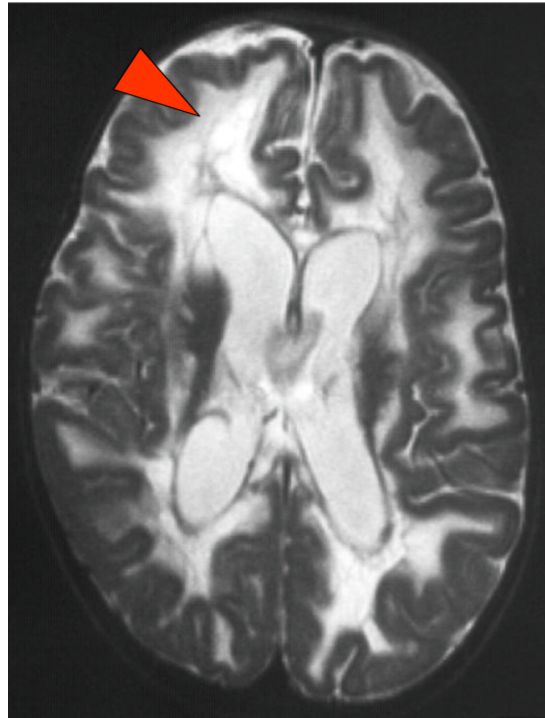


Abbildung 4.2: Im T<sub>2</sub> – gewichteten Bild der kraniellen Kernspintomographie der Indexpatientin (D.II.1) erkennt man ausgedehnte leukodystrophe Veränderungen mit konsekutiver Erweiterung beider Seitenventrikel. Im rechten Frontallappen sieht man eine makrozystische Degeneration (roter Pfeil) der weißen Substanz.

monische Rosenthal – Fasern konnten nicht nachgewiesen werden, da kein Hirnbiopsiematerial vorlag.\* Die Laktatkonzentrationen waren im Plasma normal, im Liquor jedoch deutlich erhöht. In einer Muskelbiopsie und in gezüchteten Fibroblasten konnte ein isolierter Atmungskettenkomplex I – Mangel nachgewiesen werden. Das Mädchen ist nun 10 Jahre alt, spastisch, blind und makrozephal. Beide Geschwister der Indexpatientin, ein Junge und ein Mädchen, sind gesund.

### 4.3 Patienten mit isoliertem Komplex III – Mangel

Es wurden 33 Patienten mit isoliertem Komplex III – Mangel untersucht. Ihre klinischen Phänotypen und biochemischen und molekulargenetischen Befunde sind in Abschnitt 6.3 auf Seite 74 summarisch dargestellt. Bei 4 Patienten wurden neue Se-

---

\* In einer kürzlich erschienen Publikation von Brenner *et al.* (2001) wurden Mutationen im Gen des Glial – Fibrillary – Acidic – Protein (GFAP) als Ursache des *Morbus Alexander* gefunden. Bei diesen Patienten wurden in *post mortem* Untersuchungen Rosenthal – Fasern nachgewiesen [24]. Bei unserer Patientin handelt es sich am ehesten um eine Phänokopie.



quenzvarianten im mitochondrial kodierten *Cytochrom b* – Gen gefunden, davon war eine Mutation sicher pathogen. Die klinische Verläufe dieser Patienten werden im folgenden detailliert dargestellt.

### **Familie E, Patient 7 (Tabelle 6.3 auf Seite 74)**

**Indexpatient E.II:2:** Der 25 – jährige männliche Patient ist das zweite Kind gesunder, nicht blutsverwandter Eltern (Stammbaum in Abb. 6.13A, S. 80) . Eine jetzt 30 Jahre alte Schwester leidet an einer Epilepsie ohne Hinweis auf eine Myopathie oder Belastungsintoleranz. Beim Indexpatienten traten erste Symptome im Alter von 7 Monaten auf. Er war in diesem Alter muskelhypoton und hatte ein erhöhtes Schlafbedürfnis. Die motorische und mentale Entwicklung waren verzögert. Freies Laufen war ihm erst ab dem 30. Lebensmonat möglich. Er besuchte eine Schule für geistig Behinderte, lernte dort zu lesen, nicht jedoch zu schreiben. Gegenwärtig arbeitet er in einer beschützten Werkstatt. Im Alter von 20 Jahren kam es im Rahmen einer fiebrigen Gastroenteritis zu einer metabolischen Krise mit schwerer Laktatazidose (31 mmol/L [Normwert: 0,5 – 2,2]), Rhabdomyolyse (CK >3.000 U/L [Normwert: < 79]) und Harnsäureanstieg (14 mg/dl [Normwert: 2-6]). Der Patient mußte intensivmedizinisch betreut werden.

Bei der körperlichen Untersuchung fielen ein Kleinwuchs (150 cm im Alter von 24 Jahren), ein Mikrozephalus, dysplastische Ohren und ein ausgeprägter Hirsutismus auf. Bei der ophthalmologischen Untersuchung fand sich eine Retinitis pigmentosa mit Verengung der retinalen Blutgefäße und eine Atrophie des Sehnerven. Der Visus war beidseits auf 0.6 reduziert. Es bestand ein beidseitiger lateraler Gesichtsfelddefekt. Die Muskeleigenreflexe waren gesteigert, das Babinski-Zeichen war negativ. Es bestand eine beidseitige Dysdiadochokinese. Unter geringen Belastungen wurde der Patient kurzatmig, klagte jedoch nicht über Muskelkrämpfe.

Seine körperliche Belastungsinsuffizienz zeigte sich in der Fahrradergometrie, die unter der geringen Belastung von 50 Watt schon nach kurzer Zeit abgebrochen werden mußte (Abb. 4.4). Das EKG zeigte ein Wolff – Parkinson – White – Syndrom mit verbreiterten QRS – Komplexen und Delta – Wellen. In der Echokardiographie stellte sich eine linksventrikuläre, nicht obstruktive Hypertrophie des Myokards dar, dessen Kontraktilität unter der Behandlung mit Nitraten und Diuretika an der unteren Grenze der Norm lag. Die Echodichte beider Nieren war sonographisch erhöht und der Serumkreatinin-Wert lag kontinuierlich über 1,2 mg/dl. Es bestand keine Aminoazidurie.

Im MRT (Abb. 4.3) sah man verbreiterte Seitenventrikel und ein vollständiges Fehlen

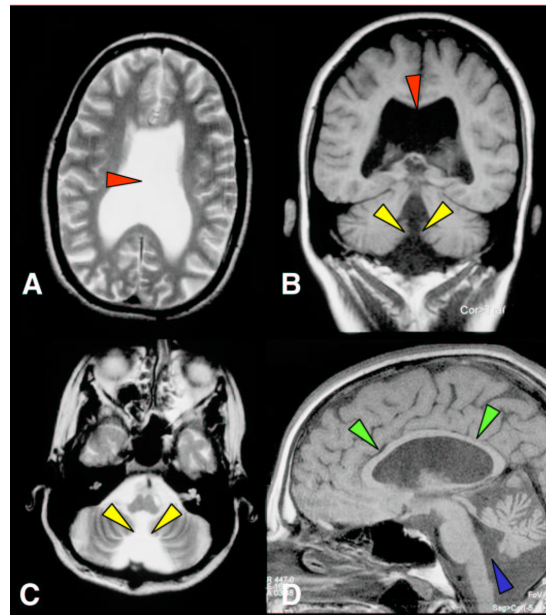


Abbildung 4.3: Schädel MRT des Patienten E.II:2 mit isoliertem Komplex III – Mangel (A) Transversalschnitt in der T<sub>2</sub> – Wichtung. Der rote Pfeil kennzeichnet die Stelle des fehlenden Septum pellucidum. Beide Seitenventrikel sind symmetrisch erweitert. (B) Coronschnitt in T<sub>1</sub> – Wichtung mit Darstellung des Zykloventrikels (roter Pfeil) und der Kleinhirnober- und – unterwurmhypoplasie (gelbe Pfeile) (C) Transversalschnitt in T<sub>2</sub> – Wichtung. Aufgrund einer Kleinhirnhypoplasie (gelbe Pfeile) stellen sich der vierte Ventrikel und die Cisterna magna erweitert dar. (D) Im Sagittalschnitt in T<sub>1</sub> – Wichtung sieht man die Hypoplasie des Corpus callosum (grüne Pfeile) und des Kleinhirns. Das Foramen Magendie ist deutlich erweitert (blauer Pfeil).

des Septum pellucidum. Sowohl das Corpus callosum als auch die Sehnerven waren hypoplastisch. Die Basalganglien waren normal angelegt. Die Hypophyse war nachweisbar, jedoch deutlich hypoplastisch. Aufgrund einer partiellen Kleinhirnober – und – unterwurmhypoplasie waren der vierte Ventrikel, das Foramen Magendie und die Cisterna magna erweitert.

Die Messung der Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe im Muskelgewebe ergab einen isolierten Komplex III – Mangel. Dieser ließ sich auch in gezüchteten Fibroblasten nachweisen (Tabelle 6.4 auf Seite 77). In der Muskelhistologie fanden sich keine ragged – red – fibers. Eine Aminoazidurie und ein systemischer/muskulärer Carnitinmangel konnten ausgeschlossen werden.

### Familie F, Patient 15 (Tabelle 6.3 auf Seite 74)

**Patient F.II:6** Der Patient war das sechste Kind gesunder, blutsverwandter Eltern (Cousin und Cousine 1. Grades). Ein verstorbener Bruder zeigte einen ähnlichen klinischen Verlauf. Die anderen Geschwister sind gesund (siehe Stammbaum in Abb. 6.13B

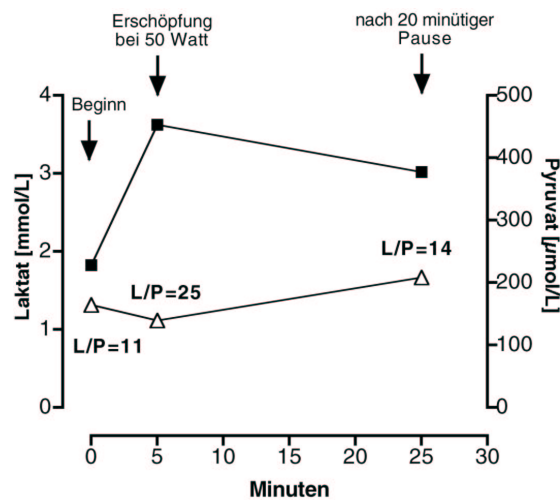


Abbildung 4.4: Belastungstest des Patienten E.II:2 mittels Fahrradergometrie. Die **schwarzen Vierecke** bezeichnen die Laktatkonzentration, die **offenen Dreiecke** die Pyruvatkonzentration. Der in Ruhe bestimmte Laktatwert lag mit 1.8 mmol/L im Normbereich (0,5 – 2,2), der Laktat/Pyruvat (L/P) – Quotient war normal. Der Patient erschöpfte sich nach 6 Minuten bei einer Belastung von weniger als 1 Watt/kg Körpergewicht. Es fand sich ein steiler Anstieg der Laktatkonzentration im Serum. Der L/P – Quotient war mit 25 pathologisch erhöht (Normalwert: <15). Selbst nach 20 – minütiger Pause war die Laktatkonzentration im Serum noch nicht wieder auf den Ausgangswert abgefallen. Diese Befunde legen eine Störung der oxidativen Phosphorylierung nahe.

auf Seite 80). Im Alter von zwei Wochen erkrankte der Patient an einer Pneumonie. Im Alter von 10 Wochen wurde er erneut mit Fieber und Tachypnoe stationär aufgenommen. Er war zu diesem Zeitpunkt hyperglykämisch (BZ 30,5 mmol/L) und ketoazidotisch (pH 7,1, BE -18 mmol/l). Das Serum-Laktat war normal. Eine zu diesem Zeitpunkt begonnene Insulinbehandlung mußte kontinuierlich fortgesetzt werden. Ab dem 6. Lebensmonat fiel eine motorische Entwicklungsretardierung auf. Der Junge konnte nie frei sitzen oder sprechen. Abgesehen von einer ausgeprägten Muskelhypotonie fanden sich keine neurologischen Defizite.

Im Alter von 12 Monaten wurde der Patient zum dritten Mal mit einem hochfieberhaften Harnwegsinfekt stationär aufgenommen. Der Blutzucker lag bei 11 mmol/L. Darüber hinaus fand sich eine Granulozytopenie (0.2 Granulozyten/nl). Eine Knochenmarkspunktion ergab eine stark erniedrigte Granulopoese. Eine Therapie mit GCSF (granulocyte – colony – stimulating – factor) erhöhte die Anzahl der peripher zirkulierenden Granulozyten auf 13,5/nl. Darüber hinaus fand sich eine Leberdysfunktion mit Anstieg der Transaminasen bei jedoch normaler  $\gamma$ GT und alkalischer Phosphatase. Bei der MRT-Untersuchung des Gehirns fand sich eine Pachygyrie.

In einer Muskelbiopsie wurde ein isolierter Atmungskettenkomplex III – Mangel nach-

gewiesen (Tabelle 6.4 auf Seite 77). Die histologische Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten, elektronenmikroskopisch waren die Mitochondrien jedoch abnorm vergrößert. Im Alter von 17 Monaten wurde der Patient zum vierten Mal stationär aufgenommen. Im Rahmen eines fieberhaften Infektes kam es zu einer ausgeprägten Leberzellschädigung (ALAT 19.068 U/l, ASAT 93.087 U/l, LDH 31.332 U/l, AP 412 U/l, Gesamt – Bilirubin 53  $\mu$ mol/L, davon 81% konjugiertes Bilirubin) mit einer sonographisch deutlich vermehrten Echodensität des Leberparenchyms. Die Gallenwege erschienen nicht pathologisch verändert. Der Patient verstarb einen Tag nach stationärer Aufnahme an einem Kreislaufschock.

### **Familie G, Patientin 21 (Tabelle 6.3 auf Seite 74)**

Über die Familien – und Perinatalanamnese dieser Patientin ist nichts bekannt. Sie stammt aus Kolumbien und wurde im Alter von 2 Jahren adoptiert. Zum damaligen Zeitpunkt fielen ein Makrozephalus (3 cm > 97. Perzentile), eine Muskelschwäche und Belastungsintoleranz auf. Aufgrund einer erhöhten Urinausscheidung von Glutarsäure wurde ein Glutarazidurie Typ I vermutet, aber biochemische Untersuchungen der Glutaryl – CoA – Dehydrogenase ergaben Normalwerte. Unter oraler Glukosebelastung stieg das Serum – Laktat auf 2,4 mmol/L [Normwert: 0,5 – 2,2]. Dabei war das Laktat/Pyruvat – Verhältnis normal. Auch nach den Mahlzeiten stieg das Serum – Laktat auf maximal 4,1 mmol/L an. Die Messung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe in der Muskelbiopsie ergab einen isolierten Komplex III – Mangel (Tabelle 6.4 auf Seite 77). Ein PDH – Mangel wurde biochemisch ausgeschlossen. Ein im Alter von 5 Jahren angefertigtes MRT der weißen und grauen Hirnsubstanz war normal. Der klinische Verlauf der Erkrankung ist chronisch progredient. Die Patientin hat eine Hepatomegalie, andere Organe scheinen nicht betroffen zu sein. Die Herzfunktion ist normal. Das Mädchen ist jetzt 6 Jahre alt und geistig retardiert.

### **Familie H, Patientin 26 (Tabelle 6.3 auf Seite 74)**

Die Patientin war das erste Kind gesunder Eltern. Zur Konsanguinität lagen keine sicheren Angaben vor. Der Bruder und die Schwester der Mutter sind vor längerer Zeit an einer progredienten neurodegenerativen Erkrankung verstorben. Genauere Angaben zum Verlauf der Erkrankungen sind nicht zu erheben. Der jüngere Bruder der Patientin leide an der gleichen Erkrankung, seine Symptome seien jedoch schwächer ausgeprägt. Schwangerschaft und Geburt der Patientin waren normal. Die frühkindliche Ent-

wicklung verlief unauffällig. Ab dem Alter von 3 Jahren traten eine Gangstörung und eine Choreoathetose auf. Im kraniellen MRT kamen bilaterale striatale Läsionen zur Darstellung. In Zusammenhang mit einem erhöhten Liquorlaktat von 2,5 mmol/L wurde die Diagnose eines Leigh – Syndroms gestellt. Im Serum wurden normale Laktat – , jedoch erhöhte Alanin – Konzentrationen gemessen. In der Muskelbiopsie wurde biochemisch ein isolierter Komplex III – Mangel gefunden. Die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase war normal. Ab dem Alter von 6 Jahren entwickelte das Mädchen eine Myoklonusepilepsie und eine rasch progrediente Spastik. Die Herzfunktion blieb normal. Die geistige und sprachliche Entwicklung der Patientin waren stark retardiert. Ein im Alter von 12 Jahren angefertigtes MRT zeigte im Bereich der Putamen und subcortical fronto – temporal beidseits hypodense Läsionen und eine Erweiterung des supratentoriellen Ventrikelsystems im Sinne einer Hirnatrophie. Im Alter von 15 Jahren verstarb die Patientin an einer rasch progredienten zentralen Atemstörung.

# Kapitel 5

## Material und Methoden

### 5.1 Messung der Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette

#### 5.1.1 Gewinnung und Vorbereitung des Materials

Vor jedem Eingriff wurden die Patienten bzw. ihre Eltern entsprechend der Deklaration von Helsinki [1] über den Nutzen und die Risiken des Eingriffs aufgeklärt.

Hautbiopsien von ca. 3 mm Kantenlänge wurden in lokaler Infiltrationsanästhesie mit 2% Lidocain entnommen. Die Hautbiopsie wurde bis zur Weiterverarbeitung in isotoner Kochsalzlösung bei 4°C aufbewahrt. Zur Anlage von Fibroblastenkulturen wurde das Hautstück mit einem Skalpell zerkleinert. Das Wachstum der Fibroblastenkulturen erfolgte in M199 Medium (Gibco) supplementiert mit 20% fetalem Kälberserum. Zur Aktivitätsmessung der verschiedenen Atmungskettenkomplexe wurden ca.  $20 \times 10^6$  Fibroblasten pro Meßreihe eingesetzt. Enzymaktivitäten wurden in einer Mitochondrien – angereicherten Fraktion gemessen [220].

Muskelbiopsien wurden in der Regel als Nadelbiopsie vom rechten Musculus vastus lateralis unter Kurznarkose mit Ketamin entnommen. Hierbei wurden entsprechend dem Alter des Patienten Bergström – Biopsienadeln mit Durchmessern zwischen 2 und 5 mm verwendet. Das Muskelbiopsat wurde nach der Entnahme geteilt. Ein kleiner Anteil wurde in Glutaraldehyd für die Elektronenmikroskopie fixiert. Das übrige Gewebe wurde zu etwa gleichen Teilen (a) sofort in flüssigem Stickstoff für die biochemischen Analysen schockgefroren und (b) auf Korkplättchen aufgebettet und über einen Zwischenschritt in flüssigem Isopropanol ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Zwischenschritt in flüssigem Isopropanol soll Gefrierartefakte reduzieren.

Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

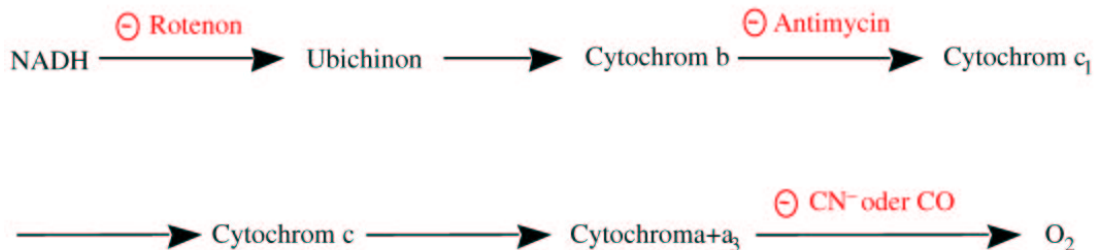
Aufarbeitung der Muskelprobe: Ein Muskelstück von ca. 200 mg wurde von Fett und Bindegewebe befreit und in 2 ml SETH (0,25 M Sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, 50 000 U Heparin/ 100 ml, pH 7,4) Puffer aufgenommen. Das Muskelstück wurde daraufhin mit einem Chopper kleingehackt und anschließend mit einem Potterstab homogenisiert. Ein Teil dieses Homogenats wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Rest wurde bei 600 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 100  $\mu\text{L}$  aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Aufarbeitung der gezüchteten Hautfibroblasten: Hautfibroblasten sind im Vergleich zu Muskelzellen mit nur wenigen Mitochondrien ausgestattet. Daher muß zur Messung der Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe aus den gezüchteten Fibroblasten eine mit Mitochondrien angereicherte Fraktion gewonnen werden. Ungefähr  $10^6$  Fibroblasten wurden in 2 ml SETH Puffer gewaschen und anschließend mit dem Potterstab homogenisiert. Ein Aliquot des Homogenats wurde zur Bestimmung der Markerenzyme Cytochrom c – Oxidase und Citratsynthase und zur Eiweißbestimmung eingefroren. Der Rest wurde für 10 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand mit der Mitochondrienfraktion wurde in ein neues Gefäß überführt. Dieser wurde zur Bildung eines Mitochondrienpellets für 30 Minuten mit 12.000 g zentrifugiert. Am Ende wurde der Überstand verworfen und das Mitochondrienpellet in ca. 100  $\mu\text{L}$  SETH Puffer resuspendiert. Auf diese Weise erhält man eine Mitochondrienfraktion mit ca. 20 fach angereicherter Aktivität der Atmungskettenenzyme. Da während der Anreicherungsprozedur die Mitochondrien geschädigt und teilweise aufgebrochen werden können, verlieren sie Matrixenzyme wie z.B. die Citratsynthase. Aus diesem Grunde wurden die Aktivitäten in der angereicherten Fraktion nicht auf die Citratsynthase – Aktivität, sondern auf die Cytochrom c – Oxidase – Aktivität bezogen, da sich die gesamte Cytochrom c – Oxidase – Aktivität, wie auch die der anderen Atmungskettenenzyme, in der Membranfraktion der Mitochondrien befindet.

### 5.1.2 Messung der Gesamtfunktion der Atmungskette

Diese Messung ermöglicht einen Überblick über die gesamte Atmungskettenfunktion. Als Ausgangsmaterial wird NADH verwendet. Die Nettoreaktion der Atmungskette lautet:  $\text{NADH} + \text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ . Die Abnahme der NADH – Konzentration kann spektrophotometrisch durch Abnahme der Extinktion bei  $\lambda=340\text{ nm}$  gemessen werden. Der Elektronentransfer findet jedoch über mehrere Zwischenschritte

statt. Die Spezifität der Gesamtreaktion wird geprüft indem man testet, ob sich Einzelschritte der Gesamtreaktion durch Rotenon, Antimycin A und Cyanidionen spezifisch hemmen lassen. Die spezifischen Hemmsubstanzen sind rot hervorgehoben:



Bei der *in vitro* – Reaktion wird Kaliumferricyanid statt Sauerstoff als Elektronenakzeptor benutzt. Die Kinetik der Extinktionsabnahme bei  $\lambda=340$  nm gibt Auskunft über die integrale Funktion der Atmungskette. Die technischen Details der Reaktion sind in Trounce *et al.* (1999) beschrieben [198]. Die NADH:O<sub>2</sub> – Oxidoreduktase – Aktivität wird sowohl im Homogenat als auch im 600 g – Überstand gemessen. Die Aktivitätsangaben werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

### 5.1.3 Messung der Komplex I – Aktivitäten

Bei Messung des Komplexes I wird die NADH:Ubichinon – Oxidoreduktase – Aktivität des Homogenats bzw. des 600 g – Überstandes bestimmt. Die Nettoreaktion lautet:  $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CoQ}_{ox} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQH}_2$  (CoQ = Coenzym Q oder Ubichinon). Zur Bestimmung der Reaktionskinetik wird die Abnahme der Extinktion bei  $\lambda=340$  nm gemessen. Die Reaktion ist spezifisch mit Rotenon hemmbar. Da die Proben immer auch eine gewisse unspezifische NADH:Ubichinon – Oxidoreduktaseaktivität aufweisen, muß zur spezifischen Aktivitätsbestimmung die Differenz aus Gesamtaktivität und unspezifischer Aktivität (d.h. der Aktivität nach Hemmung durch Rotenon) gebildet werden [198]. Die NADH:Ubichinon – Oxidoreduktaseaktivitäten werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

#### 5.1.4 Messung der Komplex II+III – Aktivitäten

Die Reaktion der Succinat:Cytochrom c – Oxidoreduktase (Komplex II + III) lautet:  
 $\text{Succinat} + \text{FAD}^+ \longrightarrow \text{FADH} + \text{H}^+ + \text{Fumarat}; \text{FADH} + \text{H}^+ + \text{CoQ}_{ox} \longrightarrow \text{FAD}^+ +$



CoQH<sub>2</sub> (Succinatdehydrogenase). Im Anschluß daran gestaltet sich der Elektronenfluß wie folgt: CoQH<sub>2</sub> → Cytochrom c<sub>1</sub> → Cytochrom c (Ubichinol: Cytochrom c – Oxidoreduktase). Die Extinktionszunahme von reduziertem Cytochrom c kann bei λ=550 nm spektrophotometrisch gemessen werden. Um zu verhindern, daß das reduzierte Cytochrom c gleich durch die Cytochrom c – Oxidase oxidiert wird, setzt man dem Reaktionsgemisch Natriumazid hinzu, welches die Cytochrom c – Oxidase hemmt. Die Reduktion des Ubichinons wird durch eine Hemmung der Komplex I – Aktivität durch Rotenon verhindert [198]. Die Succinat: Cytochrom c – Oxidoreduktaseaktivitäten werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen. Ergeben sich Auffälligkeiten in dieser Kombinationsuntersuchung, müssen die Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe II und III separat gemessen werden.

### 5.1.5 Messung der Komplex II – Aktivitäten

Die Enzymaktivität des Komplexes II (Succinat: Ubichinon – Oxidoreduktase) wird mit Hilfe des künstlichen Elektronenakzeptors Dichlorophenolindophenol (DCPIP) gemessen. Die Reaktion läuft wie folgt ab: Succinat + FAD<sup>+</sup> → FADH + H<sup>+</sup> + Fumarat; FADH + H<sup>+</sup> + DCPIP<sub>ox</sub> → FAD<sup>+</sup> + DCPIPH<sub>2</sub>. Die Extinktionsabnahme des verbrauchten DCPIP kann spektrophotometrisch bei λ=600 nm verfolgt werden. Zur Hemmung von Komplex I wird zum Reaktionsgemisch Rotenon hinzugesetzt. Die Reaktion ist spezifisch mit Antimycin A hemmbar. Ist nach Hemmung noch eine unspezifische Enzymaktivität zu messen, so wird diese von der Gesamtaktivität abgezogen [198]. Die Succinat: Ubichinon – Oxidoreduktaseaktivitäten werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

### 5.1.6 Messung der Komplex III – Aktivitäten

Die Enzymaktivität von Atmungskettenkomplex III (Ubichinol: Cytochrom c – Oxidoreduktase) wird mit Hilfe des künstlichen Substrats Decyl – Ubichinon – H<sub>2</sub> (DUH<sub>2</sub>) gemessen. DUH<sub>2</sub> wird durch Komplex III oxidiert und das gleichzeitig hinzugegebene Cytochrom c reduziert. Die Extinktionszunahme des oxidierten Cytochrom c kann bei λ=550 nm spektrophotometrisch bestimmt werden. Um zu verhindern, daß das neu entstandene reduzierte Cytochrom c durch die Cytochrom c – Oxidase (Komplex IV) oxidiert wird, fügt man dem Reaktionsgemisch Natriumazid zur Hemmung der Cytochrom c – Oxidase hinzu. Als spezifische Komplex III – Aktivität gilt die Differenz

zwischen Gesamtaktivität und unspezifischer Aktivität (nach Hemmung mit Antimycin A) [198]. Die Ubichinol:Cytochrom c – Oxidoreduktaseaktivitäten werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

### 5.1.7 Messung der Komplex IV – Aktivitäten

Zur Messung des Atmungskettenkomplexes IV (Cytochrom c – Oxidase) läßt man reduziertes Ferro – Cytochrom c aus Rinderherzen durch die Cytochrom c – Oxidase oxidieren. Die Reaktion kann durch die spektrophotometrische Extinktionsabnahme bei  $\lambda=550$  nm verfolgt werden [198]. Die Cytochrom c – Oxidaseaktivitäten werden auf die Aktivität der Citratsynthase oder auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

### 5.1.8 Messung der Citratsynthase – Aktivitäten

Die Citratsynthase ist das am häufigsten benutzte Markerenzym der Mitochondrienmatrix. Bei einer Schädigung tritt das Enzym aus dem Mitochondrium aus. Es ist daher ein wichtiger Marker für die Integrität von Mitochondrien. Patienten mit einem Citratsynthase – Mangel sind nicht bekannt. Da die Citratsynthase eine Schlüsselrolle im Citratzyklus spielt, scheint ihr Mangel nicht mit dem Leben vereinbar zu sein. Der Assay verfolgt die Reduktion von 5,5' – dithiobis(2 – Nitrobenzoesäure) bei  $\lambda=412$  nm, welche an die Reduktion von Acetyl – CoA durch die Citratsynthase in Anwesenheit von Oxalazetat gekoppelt ist. Die Citratsynthase-Aktivitäten werden auf den Gesamtproteingehalt bezogen.

### 5.1.9 Messung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [131]. Der Test beruht darauf, daß  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen unter basischen Bedingungen mit den Peptidbindungen der Proteine Komplexe bilden und dadurch zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden. Diese Ionen bilden mit dem Folin – Ciocalteu – Reagenz einen instabilen blauen Komplex, dessen Farbintensität als Maß der Proteinkonzentration dient. Zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentrationen wird eine Eichgerade mit bekannten Proteinverdünnungen aus bovinem Serumalbumin erstellt. Die Extinktion des blaufarbenen Komplexes wird spektrophotometrisch bei  $\lambda=500$  nm bestimmt.

## 5.2 Molekulargenetische Techniken

### 5.2.1 Klonierung der *NDUFV1*-cDNA

Menschliche Gesamt – RNA wurde aus  $10^7$  mononukleären Blutzellen aus frischem Buffy – Coat mit RNazol B extrahiert und in einem Ansatz mit Superscript Reverser Transcriptase, Zufalls – Hexameren und poly(T) – Primern bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Um sowohl den gesamten Leserahmen als auch die 5' – und 3' – UTRs zu amplifizieren, wurde die RACE – Technik (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) angewandt [65, 31]. Die genspezifischen Oligonukleotid – Primer 51cDNA1F und 51cDNA2R wurden entworfen, nachdem bereits bekannte menschliche Genfragmente (GenBank S67973, S53175) und die bovine Sequenz (GenBank M58607) aneinander ausgerichtet wurden (Clustal – Alignment). Die Sequenzen aller in dieser Untersuchung benutzter Oligonukleotid – Primer sind in Tabelle 5.1 auf Seite 45 aufgelistet. Zur PCR wurde AmpliTaq – Polymerase und ein lizenziertes GeneAmp 2400 PCR – System von Perkin Elmer benutzt. Jede PCR wurde mit dem OptiTaq – Protokoll (BIOS Laboratories) optimiert. Das zunächst gewonnene 624 bp lange PCR – Fragment wurde auf einem Agarosegel gereinigt, ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe von Zentrifugen – Säulen (Quiagen) eluiert. Die automatische Sequenzierung erfolgte mit dRhodamin – Didesoxy – Farbterminatoren und FS – AmpliTaq – Polymerase auf dem ABI Prism 377 DNA – Sequenzierungsgerät. Die so erlangte Sequenz entsprach fast vollständig dem GenBank cDNA – Fragment S67973 mit Ausnahme eines CG anstatt eines GC an Position nt449 – 450. Dies kann durch einen Sequenzierungsfehler oder eine Sequenzvariante bedingt sein. Das zentral gelegene cDNA – Fragment (nt292 – 913) wurde benutzt, um weitere genspezifische Primer (GSP) für die RACE – Technik zu entwerfen. Zur halbverschachtelten Amplifikation der 5' – UTR wurden der 5' – RACE – Kit und die Oligonukleotid – Primer 5' – GSP1, 5' – GSP2 und 5' – GSP3 benutzt. Zur Amplifikation der 3' – UTR wurden der 3' – RACE – Kit und die Oligonukleotid – Primer 3' – GSP1 und 3' – GSP2 eingesetzt. Die resultierenden PCR – Produkte wurden anschließend mit den Oligonukleotid – Primern 5' – GSP3 und 3' – GSP2 nur vom 3' – zum 5' – Ende sequenziert, da eine umgekehrte Sequenzierung durch die ungenaue Primer – Anlagerung an dem poly(A/G) – Schwanz unmöglich ist. Bei Kenntnis der 5' – und 3' – UTR des Gens konnte ein Oligonukleotid – Primerpaar entworfen werden, das den gesamten offenen Leserahmen des Gens in sich einschließt (5'Upstream und 3'Downstream). Die PCR mit diesen Oligonukleotid – Primern ergab ein ca. 1.5 kbp langes Fragment, dessen beide Stränge mit den in Tabelle 5.1

| Primer Bezeichnung                                      |           | Oligonukleotid Sequenz               | Position        |
|---|-----------|--------------------------------------|-----------------|
| <i>5'-RACE:</i>   |           |                                      |                 |
| 5'-GSP1   | rückwärts | 5'-GGCCTCATTGTAGAATTCCCC-3'          | 498-478         |
| 5'-GSP2   | rückwärts | 5'-TTCACCACCAGATACTTGGGCCTGC-3'      | 347-323         |
| 5'-GSP3   | rückwärts | 5'-GAGGGCTTATTCATGAAGCTCC-3'         | 317-296         |
| <i>3'-RACE:</i>   |           |                                      |                 |
| 3'-GSP1   | vorwärts  | 5'-ACAACTGTGGCCAACGTGGAGA-3'         | 718-739         |
| 3'-GSP2   | vorwärts  | 5'-CTGGTTTGCTGGCTTTGGCAGAGAA-3'      | 780-804         |
| <i>cDNA Sequenzierung:</i>                              |           |                                      |                 |
| 5'Upstream  | vorwärts  | 5'-GAAGGTGACAGCGTGAGGTGA-3'          | (-39)-(-19)     |
| 51cDNA1F  | vorwärts  | 5'-AAGTGGAGCTTCATGAATAAGCC-3'        | 292-314         |
| 51cDNA2F  | vorwärts  | 5'-TGCAGGTGGCCATCCGAGAGGCCTA-3'      | 506-530         |
| 51cDNA3F  | vorwärts  | = 3'-GSP1                            | 718-739         |
| 51cDNA4F  | vorwärts  | 5'-ACTTCGATGCGCTGCTGTCAGGC-3'        | 1013-1034       |
| 51cDNA5F  | vorwärts  | 5'-TGTGGGAGATCAGCAAGCAGAT-3'         | 1235-1256       |
| 3'Downstream  | rückwärts | 5'-GGCAGCACTCGCTTTATTGTCC-3'         | 1463-1442       |
| 51cDNA1R  | rückwärts | 5'-CTCTCGTGCTTATAGAATCAATGAG-3'      | 1133-1108       |
| 51cDNA2R  | rückwärts | 5'-CAGCATGCTTCTCAATCAGTTC-3'         | 913-892         |
| 51cDNA2R  | rückwärts | 5'-GGGCACAGACATCTCCTCCTC-3'          | 885-865         |
| 51cDNA3R  | rückwärts | 5'-GACTCGATGAGCGCTGTCTC-3'           | 644-625         |
| 51cDNA4R  | rückwärts | 5'-GAGGGCTTATTCATGAAGCTCC-3'         | 317-296         |
| <i>5' Ende ligationsvermittelte, einseitige PCR:</i>    |           |                                      |                 |
| Linker1   |           | 5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'      |                 |
| Linker2   |           | 5'-GAATTCAGATC-3'                    |                 |
| GSP(A)  | rückwärts | = P2                                 | 65-46           |
| GSP(B)  | rückwärts | 5'-ACCTCACGCTGTCACCTTCATAGC-3'       | (-21)-(-44)     |
| <i>PCR Primer zur Amplifikation der genomischen DNA</i> |           |                                      |                 |
| P1  | vorwärts  | 5'-TAAGGAGGGAGCCGAAAGAGCG-3'         | (-318)-(-297)   |
| P2  | rückwärts | 5'-CCGCTGAAACGCACAGATAC-3'           | 65-46           |
| P3  | vorwärts  | 5'-CGCGGTATCTGTGCGTTTCAGCGGCGACA-3'  | 41-70           |
| P4  | rückwärts | 5'-TCCGGTCTTCATCCTTCAGCGAGCCAAATG-3' | 121-92          |
| P5  | vorwärts  | 5'-GTCGCCCTCAGCTGGTGCGCTC-3'         | intronisch (I)  |
| P6  | rückwärts | 5'-GAGCTTATGGAAGGTCTCACAGTC-3'       | intronisch (I)  |
| P7  | vorwärts  | 5'-CCCAAGAAAACCTCATTTGGCTC-3'        | 79-101          |
| P8  | rückwärts | = 51cDNA4R                           | 317-296         |
| P9  | vorwärts  | = 51cDNA1F                           | 292-314         |
| P10   | rückwärts | = 5'-GSP1                            | 498-478         |
| P11   | vorwärts  | 5'-AGGGGAATTCTACAATGAGGC-3'          | 477-497         |
| P12   | rückwärts | 5'-TAAGTAAGCTGCTTTGCTGCCAGG-3'       | intronisch (IV) |
| P13   | vorwärts  | 5'-TCCTTCCAGGGCTCCTAATGCTG-3'        | intronisch (IV) |
| P14   | rückwärts | = 51cDNA3R                           | 644-625         |
| P15   | vorwärts  | 5'-GGGCCTACATCTGTGGAGAGG-3'          | 605-625         |
| P16   | rückwärts | 5'-AGTTTGGTGCCTGAGTTGCG-3'           | 824-805         |
| P17   | vorwärts  | = 3'-GSP2                            | 780-804         |
| P18   | rückwärts | 5'-CATGGGTACTGCGCA-3'                | 1154-1137       |
| P19   | vorwärts  | 5'-GACAACTCCTTGCTGTGATCC-3'          | 934-955         |
| P20   | vorwärts  | 5'-TTGAGTTCTATAAGCACGAGAGCTG-3'      | 1112-1136       |
| P21   | rückwärts | = 3'Downstream                       | 1463-1442       |
| P22   | vorwärts  | = 51cDNA5F                           | 1235-1256       |

Tabelle 5.1: Oligonukleotid – Primer zur Amplifikation und Sequenzierung des *NDUFV1* – Gens. Die Position der Primer zur Bestimmung der genomischen Sequenz kann der Abbildung 6.6 auf Seite 61 entnommen werden.

aufgeführten Oligonukleotid – Primern sequenziert wurden.

### 5.2.2 Klonierung der genomischen *NDUFV1* – DNA

Menschliche genomische DNA wurde aus mononukleären Blutzellen mit der Salzextraktionsmethode gewonnen [133]. Um die Gengröße zu ermitteln und um nach möglichen Pseudogenen zu fahnden, wurde die gesamte genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem Agarosegel durch Elektrophorese nach ihrer Größe getrennt und anschließend durch Southern Blot auf einer Nylon – Membran immobilisiert. Eine 1504 bp lange cDNA – Sonde wurde mit dem Primerpaar 5'Upstream und 3'Downstream in einer PCR – Reaktion generiert und durch Zufallspriming in Gegenwart von [ $\alpha^{32}$ ]P – dCTP und dem Klenow – Fragment der DNA – Polymerase I radioaktiv markiert. Die Hybridisierung fand über 15 Stunden in 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.4, 7% SDS und 1 mM EDTA bei 65°C statt. Zur anschließenden Waschung bei 60°C über 30 Minuten wurde 40 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1% SDS eingesetzt. Die Autoradiographie wurde auf einem Phosphor – Imager (BioRad GS – 363) durchgeführt. In der Nähe des Größenmarkers von 6,6 kbp ( $\lambda$ /Hind III) fand sich eine einzelne Bande im *Hind* III/*Hpa* I – Verdau. Wie aus Tabelle 5.1 auf Seite 45 ersichtlich, wurden cDNA – Oligonukleotid – Primer entworfen, die keine der möglichen Exon – Exon Grenzen überspannten. Mit dieser Methode konnte das gesamte Gen in überlappenden PCR – Fragmenten (Abbildung 6.6 auf Seite 61) amplifiziert und sequenziert werden. Zur Amplifikation des langen Intron 1 wurde ein Expand – PCR Protokoll zusammen mit speziell entworfenen Oligonukleotid – Primern (P3 und P4) eingesetzt, welche eine hohe Hybridisierungstemperatur von 72°C aufwiesen [122]. Da die zuverlässige Leselänge des automatischen Sequenziergerätes nur ca. 500 bp beträgt, wurden noch zusätzlich verschachtelte Oligonukleotid – Primerpaare zur Sequenzierung der Introns 1 und 4 eingesetzt. Die Intron – Exon – Grenzen wurden durch Vergleich der genomischen Sequenzfragmente mit der bereits bekannten cDNA – Sequenz ermittelt.

### 5.2.3 Amplifikation der *NDUFV1* – Promotorregion.

Zur Aufklärung der genomischen *NDUFV1* – Sequenz (ohne Zuhilfenahme eines genomischen Klonen, allein mit PCR – Techniken) wurde ein von Mueller *et al.* (1989) beschriebenes Protokoll modifiziert [140]: 10  $\mu$ g gesamtgenomischer DNA wurden partiell mit *Dde* I (1U/10  $\mu$ g DNA über 1 Stunde bei 37°C) verdaut, um Fragmente mit Längen zwischen 500 bis 2000 bp zu erhalten. Der Überhang am 5' – Ende wurde in Gegenwart des Klenow – Fragmentes der DNA – Polymerase I und einer dNTP – Mischung aufgefüllt. Der Linker wurde als eine 1  $\mu$ M Lösung zubereitet. Dies geschah

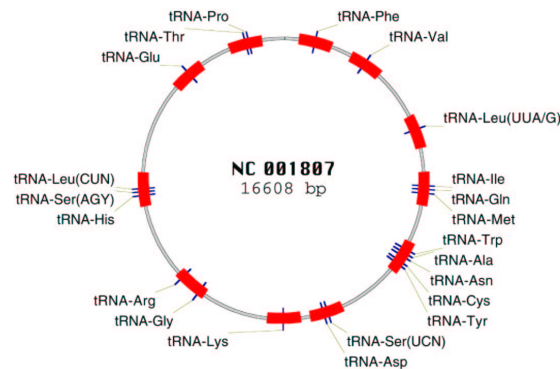


Abbildung 5.1: Darstellung der 22 mitochondrialen transfer – RNAs. Für die Aminosäuren Serin und Leucin existieren jeweils zwei unterschiedliche tRNAs mit den Codons *AGY* und *UCN* für Serin und *UUA* und *CUN* für Leucin. Die elf für das tRNA – Mutationsscreening generierten Multiplex – PCR – Fragmente sind rot abgebildet.

durch Aufkochen der Oligonukleotid – Primer Linker1 und Linker2 und anschließender langsamer Abkühlung mit ca. 1°C/Minute auf Raumtemperatur. Dies ermöglichte die Anlagerung der homologen Oligonukleotid – Sequenzen. Die Ligation zwischen aufgefüllten Restriktionsfragmenten und Linker wurde durch die T4 – Ligase in Gegenwart von ATP über 16 Stunden bei 15°C katalysiert. In der Folge konnte per halbverschachtelter PCR mit den Oligonukleotid – Primerpaaren Linker1 – GSP(A) und Linker1 – GSP(B) ein ca. 400 bp langes PCR – Fragment generiert werden, welches sich bei der automatischen Sequenzierung als 5' – UTR des *NDUFV1* – Gens herausstellte (Abbildung 6.1).

#### 5.2.4 Primerset zum Mutationsscreening mitochondrialer tRNAs

Zum Screening mitochondrialer tRNA – Mutationen wurde ein Primerset entwickelt, mit dem alle 22 mitochondrialen transfer – RNAs in wenigen Multiplexreaktionen PCR – amplifiziert und automatisch sequenziert werden können. Diese Methode ist rasch, nicht wesentlich aufwendiger als eine SSCP – Analyse (single – stranded – conformation – polymorphism) und weist eine wesentlich höhere Mutationsdetektionsrate auf (98% versus ca. 70% bei der SSCP – Analyse). Die PCR – Primer sind in Tabelle 5.2 auf Seite 48 dargestellt. Die Lage der PCR – Fragmente ist in Abbildung 5.1 dargestellt.



### 5.2.5 Sequenzierung der DNA

Alle Sequenzierungen wurden mit dem dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit von Perkin Elmer nach Protokoll durchgeführt. Die zuverlässige Leselänge zum Aufspüren heterozygoter Mutationen beträgt mit diesem Protokoll bei optimalen Versuchs-

| Primer Bezeichnung   |           | Oligonukleotid Sequenz       | Position<br>mtDNA |
|--|-----------|------------------------------|-------------------|
| <i>tRNA-Phenylalanin</i>   |           |                              |                   |
| N89  | vorwärts  | 5'-CCCATCCTACCCAGCACACACA-3' | 539-560           |
| N113   | rückwärts | 5'-GGGTGAACTCACTGGAACGG-3'   | 746-765           |
| <i>tRNA-Valin</i>  |           |                              |                   |
| N91  | vorwärts  | 5'-CAAGTATACTTCAAAGGACATT-3' | 1539-1560         |
| N90  | rückwärts | 5'-CGCTATACTTTATTTGGGTAA-3'  | 1789-1768         |
| <i>tRNA-Leucin(UUA/G)</i>  |           |                              |                   |
| N233   | vorwärts  | 5'-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3'   | 3169-3188         |
| N200   | rückwärts | 5'-TTTCGTTCCGTAAGCATTAT-3'   | 3404-3422         |
| <i>tRNAs-Isoleucin, -Glutamin, -Methionin</i>                    |           |                              |                   |
| S428   | vorwärts  | 5'-CCAGCATTCCCCCTCAAACCTA-3' | 4280-4301         |
| N83  | rückwärts | 5'-AAGATGGTAGAGTAGATGACGG-3' | 4528-4549         |
| <i>tRNAs-Tryptophan, -Alanin, -Asparagin, -Cystein, -Tyrosin</i> |           |                              |                   |
| N117   | vorwärts  | 5'-CGTACTCCTACCTATCTCC-3'    | 5509-5528         |
| N116   | rückwärts | 5'-AGAATAGTCAACGGTCGGCG-3'   | 5948-5967         |
| <i>tRNAs-Serin(UCN), -Asparaginsäure</i>                         |           |                              |                   |
| N519   | vorwärts  | 5'-ATGCCCCCCACCTACCACAC-3'   | 7433-7453         |
| N1713  | rückwärts | 5'-CCTACTTGCGCTGCATGTGCC-3'  | 7647-7645         |
| <i>tRNA-Lysin</i>  |           |                              |                   |
| N107   | vorwärts  | 5'-TCGTCCTAGAATTAATTCCC-3'   | 8250-8269         |
| N115   | rückwärts | 5'-GGGGGTAATTATGGTGGGCC-3'   | 8430-8449         |
| <i>tRNAs-Glycin, -Arginin</i>                                    |           |                              |                   |
| N119   | vorwärts  | 5'-GAAGCCGCCGCTGATACTG-3'    | 9951-9970         |
| N118   | rückwärts | 5'-GAGGATATGAGGTGTGAGCG-3'   | 10594-10575       |
| <i>tRNAs-Histidin, Serin(AGY), -Leucin(CUN)</i>                  |           |                              |                   |
| N382   | vorwärts  | 5'-TTCTCCTCCTATCCCTCAAC-3'   | 12129-12148       |
| N673   | rückwärts | 5'-AGGGTTAGGGTGGTTATAGT-3'   | 12410-12391       |
| <i>tRNA-Gutaminsäure</i>   |           |                              |                   |
| N441   | vorwärts  | 5'-CAATCAATACTAAACCCCCATA-3' | 14613-14634       |
| N674   | rückwärts | 5'-AGGTCGATGAATGAGTGGTT-3'   | 14847-14828       |
| <i>tRNAs-Threonin, -Prolin</i>                                   |           |                              |                   |
| N125   | vorwärts  | 5'-GCATCCGTACTATACTTCAC-3'   | 15848-15864       |
| N675   | rückwärts | 5'-GAGTCAATACTTGGGTGGTA-3'   | 16108-16089       |

Tabelle 5.2: Darstellung der Primer, welche für die Sequenzierung mitochondrialer tRNAs eingesetzt wurden und deren Positionen auf der mitochondrialen DNA.

bedingungen ungefähr 500 Basenpaare. In entsprechenden Abständen wurden verschachtelte Primer entworfen. Die Primer für die Sequenzierungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, sind in den Tabellen 5.1 (auf S. 45), 5.2 (auf S. 48) und 5.3 (auf S. 50) aufgeführt:

**Sequenzierung mitochondrialer Gene:** *Cytochrom c 1 – 3*, *Cytochrom b* und alle 22 mitochondrialen tRNAs.

**Sequenzierung nukleär kodierter Gene:** *NDUFV1* – cDNA und *NDUFV1* – DNA (genomisch). Die Lage der benutzten Primer auf den Genabschnitten ist in Abbildung 6.6 (S. 61) dargestellt.

Die PCR – Produkte wurden vor der Sequenzierung auf einem 1%igen Agarosegel aufgereinigt, ausgeschnitten, eluiert und anschließend sequenziert.

### 5.2.6 Haplotypanalyse mit Fluoreszenzmarkern

Fluoreszenzmarkierte Primer sind teuer. Zur Kostenoptimierung habe ich eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, mit einem Universalprimer sämtliche PCR – Fragmente zu markieren [168]. Diese Methode wurde am 15.07.1999 beim Deutschen Patentamt in München unter der Nummer 199 34 084.6 zum Patent und unter der Nummer 299 12 683.8 als Gebrauchsmuster angemeldet. Das Ziel war, ein kostengünstiges Verfahren zu entwickeln, das eine Markierung von DNA – Fragmenten während einer einzigen PCR – Reaktion ermöglicht. Bei der PCR – Amplifikation eines DNA – Fragmentes werden zwei Oligonukleotid – Primer eingesetzt. Diese sind zur amplifizierenden DNA – Sequenz komplementär, so daß sie spezifisch hybridisieren. Ein Oligonukleotid – Primer ist an seinem 5 – Ende mit einer dem Universal – Oligonukleotid – Primer homologen Adaptersequenz versehen. Die Markierungsreaktion findet in einem Reaktionsgefäß statt, in dem schon zu Beginn der PCR – Reaktion der markierte Universal – Oligonukleotid – Primer hinzugefügt wurde und sowohl die Oligonukleotid – Primerkonzentrationen als auch die PCR – Zyklusbedingungen so gewählt wurden, daß der markierte Universal – Oligonukleotid – Primer in den folgenden PCR – Zyklen in die neu synthetisierten DNA – Fragmente eingebaut wird.

Die Reaktionsschritte werden in Abbildung 5.2, S. 51 genauer beschrieben.: Als Primer für eine PCR – Testreaktion werden folgende Oligonukleotide benutzt, die nach Standardmethoden kommerziell synthetisiert wurden:



| Primer Bezeichnung  |           | Oligonukleotid Sequenz        | Position mtDNA |
|---------------------|-----------|-------------------------------|----------------|
| <i>Cytochrom C1</i> |           |                               |                |
| 553                 | vorwärts  | 5'-CTCAGCCATTTTACCTCACCC-3'   | 5877-5897      |
| 554                 | vorwärts  | 5'-TTCCCCGCATAAACACATAA-3'    | 6184-6204      |
| 556                 | vorwärts  | 5'-CGTCCTAATCACAGCAGTCCT-3'   | 6464-6484      |
| 558                 | vorwärts  | 5'-CTAGGGTTTATCGTGTGAGCA-3'   | 6750-6770      |
| 560                 | vorwärts  | 5'-CATAGGAGGCTTCATTCAGTG-3'   | 7070-7090      |
| 28                  | rückwärts | 5'-TTGAAAAAGTCATGGAGGCCAT-3'  | 7516-7495      |
| 561                 | rückwärts | 5'-ATTTTGGCGTAGGTTTGGTCT-3'   | 7138-7118      |
| 559                 | rückwärts | 5'-TGCTCACACGATAAACCTAG-3'    | 6770-6750      |
| 557                 | rückwärts | 5'-GGACTGGGAGAGATAGGAGAA-3'   | 6507-6487      |
| 555                 | rückwärts | 5'-TTATGTTGTTTATGCGGGGAA-3'   | 6204-6184      |
| <i>Cytochrom C2</i> |           |                               |                |
| 33                  | vorwärts  | 5'-TTGAAAAAGTCATGGAGGCCAT-3'  | 7495-7516      |
| 520                 | vorwärts  | 5'-CCTGTATGCCCTTTTCCTAAC-3'   | 7699-7719      |
| 521                 | vorwärts  | 5'-ACCTGCGACTCCTTGACGTTG-3'   | 7980-8000      |
| 30                  | rückwärts | 5'-GGCTCTAGAGGGGGTAGAGGGG-3'  | 8294-8273      |
| 547                 | rückwärts | 5'-CAACGTCAAGGAGTCGCAGGT-3'   | 8000-7980      |
| 546                 | rückwärts | 5'-GTTAGGAAAAGGCATACAGG-3'    | 7719-7699      |
| <i>Cytochrom C3</i> |           |                               |                |
| 593                 | vorwärts  | 5'-TCCAAGCCTACGTTTTTCACAC-3'  | 9152-9172      |
| 595                 | vorwärts  | 5'-AGGCCTTCGATACGGGATAAT-3'   | 9437-9457      |
| 597                 | vorwärts  | 5'-TACCCTCCTACAAGCCTCAGA-3'   | 9725-9745      |
| 598                 | rückwärts | 5'-AAGGCTAGGAGGGTGTTGATT-3'   | 10102-10082    |
| 596                 | rückwärts | 5'-TCTGAGGCTTGTAGGAGGGTA-3'   | 9745-9725      |
| 594                 | rückwärts | 5'-ATTATCCCGTATCGAAGGCCT-3'   | 9457-9437      |
| <i>Cytochrom b</i>  |           |                               |                |
| 441                 | vorwärts  | 5'-CAATCAATACTAAACCCCCATA-3'  | 14574-14595    |
| 1230                | vorwärts  | 5'-CACGACCAATGATATGAAAAACC-3' | 14695-14717    |
| 1232                | vorwärts  | 5'-CAACCGCCTTTTCATCAATC-3'    | 14925-14944    |
| 1235                | vorwärts  | 5'-CCTCCCATTCCGATAAAATC-3'    | 15381-15400    |
| 1237                | vorwärts  | 5'-CTAACAACTAGGAGGCGTCCT-3'   | 15600-1562     |
| 125                 | vorwärts  | 5'-GCATCCGTACTATACTTCAC-3'    | 15806-15825    |
| 124                 | rückwärts | 5'-TGATTGCTGTACTTGCTTGT-3'    | 16219-16200    |
| 1238                | rückwärts | 5'-GGAAAAAGGTTTTTCATCTCCG-3'  | 15946-15926    |
| 1236                | rückwärts | 5'-GGCTTAGTGGGCGAAATATT-3'    | 15710-15691    |
| 1234                | rückwärts | 5'-GCCTAGGAGGTCYGGTGAGA-3'    | 15499-15480    |
| 1233                | rückwärts | 5'-CTGAGTAGCCTCCTCAGATTCAT-3' | 15254-15232    |
| 1231                | rückwärts | 5'-CAGATAAAGAATATTGAGGCGC-3'  | 15024-15003    |

Tabelle 5.3: Darstellung der Primer, welche für die Sequenzierung der mitochondrialen *Cytochrom c* und *b* – Gene eingesetzt wurden und deren Positionen auf der mitochondrialen DNA.

- Ein fluoreszenz-(FAM)-markierter Universal – Oligonukleotid – Primer: FAM – *TGT AAA ACG ACG GCC AGT* – 3. Die kursiv gedruckte Sequenz oder „M13(–

21)“ genannte Sequenz, auch als Adaptersequenz bezeichnet, entspricht der – 21 Promotorsequenz des M13 – Phagen und kommt im menschlichen Genom natürlicherweise nicht vor.

- Zwei für Mikrosatelliten – Marker spezifische Oligonukleotid – Primer, von de-

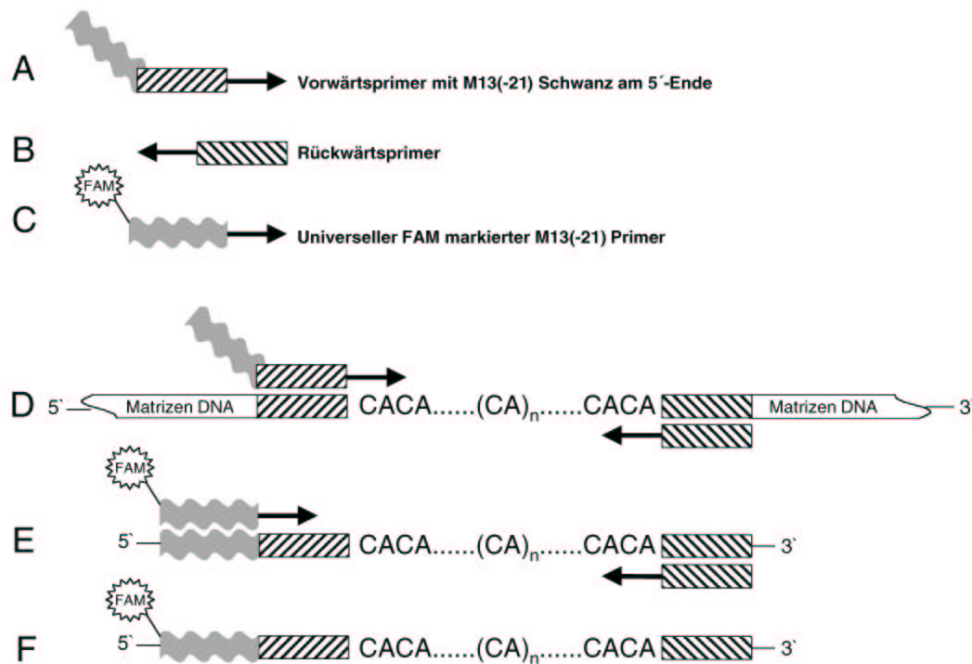


Abbildung 5.2: (A & B) Vorwärts- und Rückwärtsprimer, der gewellte Anteil stellt die universelle Adaptersequenz dar (z. B. die M13( – 21) – Sequenz), der schraffierte Anteil stellt die genspezifische Oligonukleotidsequenz dar. (C) Markierter Universal – Oligonukleotid – Primer, der Stern stellt die angekoppelte Markierung dar. Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe: (D) Zunächst lagern sich der DNA – Matrize der Vorwärts – und Rückwärts – Primer mit ihrer genspezifischen Sequenz an und werden in 3 – Richtung durch die thermostabile DNA – Polymerase verlängert. Während dieser ersten PCR – Zyklen wird die Adaptersequenz des Vorwärts – Primers in das PCR – Produkt eingebaut. (E) Die molare Konzentration der Primer ist so berechnet, daß vom Vorwärts – Primer nur ein Viertel der Konzentration des Rückwärts – und des Universal – Oligonukleotid – Primers eingesetzt wird. Dies führt dazu, daß der Vorwärts – Primer nach etwa 25 Zyklen verbraucht ist. Da zwischenzeitlich durch den Vorwärtsprimer jedoch die Adaptersequenz mit in die PCR – Produkte inkorporiert wurde, kann sich nun der markierte Universal – Oligonukleotid – Primer spezifisch anlagern und die Funktion des Vorwärts – Primers übernehmen“. Da der markierte Universal – Oligonukleotid – Primer jedoch eine geringere Schmelztemperatur hat, muß die Temperatur bei den folgenden 8 – 10 Zyklen für die Anlagerungsreaktion auf 53°C abgesenkt werden. (F) Das fertige PCR – Endprodukt ist nun an seinem 5 – Ende markiert und um die Anzahl der Basenpaare der Adaptersequenz länger als ein vergleichbares PCR – Produkt, welches nur mit den rein sequenzspezifischen Oligonukleotiden (schraffierte Anteile der Primer) generiert worden wäre. Vergleicht man die ermittelten Sequenzlängen für polymorphe Mikrosatelliten – Marker mit der publizierten Allelfrequenz, so muß die Anzahl der Basen der Adaptersequenz von den experimentell ermittelten Fragmentlängen abgezogen werden. Wurde mit der Taq – Polymerase amplifiziert, muß man zusätzlich eine weitere Base abziehen, die von dem 3 – terminalen Adenosin – Überhang stammt.

nen der Vorwärtsprimer 5 – *TGT AAA ACG ACG GCC AGT* AGA GAC TAG ACA AGT TGC A – 3 an seinem 5 – Ende mit der oben beschriebenen M13( – 21) – Adaptersequenz (Sequenz im Primer kursiv dargestellt) gekoppelt ist und der Rückwärtsprimer 5 – CAC TAT CTT GTT AGC TCA CT – 3.

Der PCR – Reaktionsansatz enthält in 50  $\mu$ L Gesamtvolumen 5  $\mu$ L Taq – spezifischen PCR – Puffer, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate: äquimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 ng genomische DNA, je 8 pmol UNI – und REV – Primer und 2 pmol FOR – Primer. Um eine unspezifische Bindung der DNA – Polymerase zu verhindern, wird der PCR – Reaktionsansatz zunächst für 5 Minuten auf 94°C erwärmt und erst dann 1 U Taq – Polymerase hinzugefügt. Nach Hinzugabe der Taq – Polymerase startet das folgende Thermocycler – Protokoll: 30 Zyklen: Denaturierung: 94°C (30 sec), Anlagerung: 56°C (45 sec), Extension: 72°C (45 sec); 8 Zyklen: Denaturierung 94°C (30 sec), Anlagerung: 53°C (45 sec), Extension 72°C (45 sec); abschließende Elongation: 72°C (600 sec)

1  $\mu$ L des PCR – Produktes wird mit 20  $\mu$ L deionisiertem Formamid und 0,5  $\mu$ L eines 50 bp ROX Standard (Perkin Elmer) vermischt. Nach 2 minütiger Erhitzung auf 94°C und anschließender Schockkühlung im Eisbad wird die Probe auf einem Kapillarsequenzierungsgerät (z.B. ABI 310 Prism Genetic Analyzer) oder einem Gelsequenzierungsgerät (z.B. ABI 377 Prism Genetic Analyzer) mit Laserdetektion analysiert.

## 5.3 Quantitative Analyse der DNA

### 5.3.1 Gewebsverteilung der *NDUFVI* – mRNA

Ein Masterblot mit immobilisierter menschlicher poly A<sup>+</sup> mRNA aus verschiedenen fetalen und adulten Geweben wurde bei 65°C mit einer radioaktiv markierten cDNA – Sonde (siehe Seite 44) hybridisiert, welche sich im Southern – Blot als spezifisch erwiesen hatte. Die Autoradiographie wurde mit einem Phosphor – Imager durchgeführt und die Signalstärke mittels Densitometrie und Volumenintegration berechnet. Die *NDUFVI* – mRNA – Mengen wurden auf *Ubiquitin* – mRNA – und *HPRT* – mRNA – Mengen geeicht.

### 5.3.2 Quantifizierung der mutierten mitochondrialen DNA

Zur experimentellen Bestimmung des Heteroplasmiegrades wurde die PCR – PIRA – Technik angewandt. Das Akronym steht für „primer induced restriction analysis“. Ge-

| Mutation        | Primer vorwärts | Primer rückwärts                                | Restriktions-<br>enzym | Fragmentlänge(n)<br>Wildtyp [bp] | Fragmentlänge(n)<br>Mutation [bp] |
|-----------------|-----------------|---|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>14849T→C</b> | nt14817 – 14836 | nt15002 – 14982                                 | <i>Hae</i> III         | 186                              | 155 + 31                          |
| <b>15074T→C</b> | nt14817 – 14836 | nt15257 – 15232                                 | <i>Dde</i> I           | 257 + 93 + 64                    | 350 + 64                          |
| <b>15218A→G</b> | nt15110 – 15130 | 5'CCT CCT CAG ATT<br>CAT TGA ACT AGG<br>TGT G3' | <i>Bsp</i> 1286 I      | 137                              | 111 + 26                          |
| <b>15257G→A</b> | nt14817 – 14836 | nt15499 – 15480                                 | <i>Acc</i> I           | 439 + 244                        | 683                               |
| <b>15458T→C</b> | nt15381 – 15400 | 5'GGT GAG AAT AGT<br>GTT AAT GTC ATT<br>CCG G3' | <i>Nci</i> I           | 106                              | 79 + 27                           |
| <b>15812G→A</b> | nt15600 – 15621 | nt15946 – 15926                                 | <i>Rsa</i> I           | 214 + 133                        | 347                               |

Tabelle 5.4: Primersets und Restriktionsendonukleasen für Restriktions – Assays von Mutationen des *Cytochrom b* – Gens. Die Numerierung der Primerbasenpositionen erfolgte gemäß der Standard „Oxford“ – Sequenz (GenBank NC\_001807). Im Falle einer primer – induced – restriction – analysis (PIRA) ist die gesamte Primersequenz angegeben. Die mismatch – Basen sind unterstrichen.

legentlich wird durch eine Punktmutation eine neue Restriktionsstelle geschaffen oder eine in der Wildtypsequenz vorhandene Erkennungsstelle entfernt. Ist dies nicht der Fall, so kann man sich mit einem Mismatch – Primer behelfen. Dieser Primer führt durch eine oder mehrere Basenfehlpaarungen in das PCR – Produkt eine künstliche Restriktionsschnittstelle ein. Diese künstliche Restriktionsstelle kann durch die Punktmutation abgeschafft oder auch hinzugefügt werden. Auf diese Weise ist ein Screening einer großen Anzahl von PCR – Produkten durch Restriktionsanalyse möglich. Im Falle der mitochondrialen 7472inC Mutation kommt dieses Verfahren zur Quantifizierung der mutierten DNA zum Einsatz. Der Rückwärtsprimer (mitochondriale Sequenz nt7608 – 7588) [6] wird am 5' – Ende mit [ $\gamma^{32}$ ]P – ATP und T4 – Kinase radioaktiv markiert. Ein Vorwärts – Mismatch – Primer 5' – CAA AAA AGG AAG GAA TCG AAC CCA C – 3' wurde benutzt, um eine neue *Bsi* YI Restriktionsschnittstelle zu schaffen. Die geschnittenen PCR – Produkte wurden auf einem 10%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch separiert, auf einem Phosphor – Imager detektiert und quantitativ per Densitometrie und Volumenintegration analysiert.

Bei Auffinden einer Mutation im *Cytochrom b* – Gen mit Hilfe der automatischen Sequenzierung muß diese mit einem zweiten Verfahren bestätigt werden. Hierfür eignen sich in der Regel Restriktionsfragment – Längenpolymorphismus (RFLP) – Assays. Die Primer/Restriktionsenzym – Kombinationen sind in Tabelle 5.4 dargestellt. Die Ergebnisse einiger RFLP – Assays sind in Abbildung 6.13 auf Seite 80 dargestellt.

## 5.4 Verbrauchsmittel und verwendete Software

Restriktionsenzyme, molekulare Größenmarker, Klenow – Fragment der DNA – Polymerase I, T4 – DNA – Ligase, Superscript Reverse Transkriptase, 3' – und 5' – RACE – Kit und Oligonukleotide (Life Technologies Inc.), Expand – PCR – Kit (Takara), [ $\alpha$ 32]P – dCTP (Amersham), Human Master Blot (Clontech), AmpliTaq – Polymerase und dRhodamin – Farbterminator – Sequenzierkit (Perkin Elmer), Gel – Reinigungssysteme (Quiagen), RNazol (Biosolve BV) und Hybridisierungsmembranen (NEN Life Science Products). Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad „*pro analysi*“.

Die Sequenz Alignments wurden mit dem SEQUENCE NAVIGATOR von Perkin Elmer durchgeführt. Das BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST) auf dem Server des National Center for Biotechnology Information (NCBI) in den USA wurde zur Homologiesuche genutzt [5]. Mögliche Exon – Exon – Grenzen in der *NDUFV1* – cDNA wurden mit dem Programm RNASPL des BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE GENE FINDER aufgespürt [182]. Mögliche Transmembran – Elemente und mitochondriale Importsequenzen wurden mit den Programmen TOPPRED II1.2 und MITOPROTII analysiert [36, 35]. Densitometrische Messungen und Berechnungen wurden mit dem Programm MULTI – ANALYST 1.0.1 von BioRad durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeitsberechnungen wurden mit dem Programm MATHEMATICA durchgeführt.

# Kapitel 6

## Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Bestimmung der vollständigen Gensequenz des humanen *NDUFV1* – Gens.

Nach derzeitigem Kenntnisstand besteht Komplex I der Atmungskette aus 41 Protein – Untereinheiten. Eine Dysfunktion oder ein Fehlen jeder einzelnen Untereinheit kann potentiell zur Dysfunktion des Gesamtkomplexes führen. Liegt ein isolierter Komplex I-Mangel vor, so kann der genetische Defekt in jedem der für seine Untereinheiten kodierenden Gene (Strukturgene) liegen. Darüber hinaus ist es möglich, daß der Defekt keines der Strukturgene, sondern „übergeordnete“ Gene betrifft, die den Zusammenbau des Gesamtkomplexes gewährleisten. Nur einige dieser letzteren sogenannten Assembly – Gene sind bei *Neurospora crassa* bekannt [105, 171], beim Menschen wurden die homologen Gene noch nicht kloniert.

Vermutet man einen Defekt in einem Strukturgen, stellt sich die Frage, welche der insgesamt 34 nukleär kodierten Untereinheiten ein vielversprechender Kandidat für eine Mutationssuche ist. Bei dieser Entscheidung helfen biochemische Arbeiten, in denen die Zusammensetzung, die prosthetischen Gruppen und die Redoxzentren des Komplexes I publiziert sind [62, 61, 211].

Bei den Genen der Atmungskette handelt es sich um sogenannte „housekeeping“ – Gene, deren Integrität für die Zellfunktion essentiell ist. Phylogenetisch sind diese Gene somit „alt“. Selbst bei prokaryontischen Zellen finden sich Teile des Atmungskettenkomplexes I. So gibt es bei *Escherichia coli* ein sogenanntes *Nuo* – Operon (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase), bei dem die Gene für 14 Untereinheiten hintereinander auf einem DNA – Strang angeordnet sind [215]. Im Laufe der Evolution wurde beim



NRF-2  
 -319 CTAAGGAGGGAGCCGAAAGAGCGAGCGGTGGGGACAGCCACCGCTAAATGCCAGCCCGGTGGAGGGAGGAAGGCGGACCCC  
GC-element  
 -238 AGGCCGGTGGGACCACATCTCCAGAAAGCCCGGCGCAAGGCACTGGCCTCTCAGTCCTCCCCCGAGGAGGCGGGGCGC  
GATA box  
 -157 TGGCGAAGTTGAAGGGGCGCAGCGATACCGGTGCGCGGCGCTGGCGTGGGCGCGTGACGTCTTTCCTGCGCGCCACCTAG  
 □  
 -76 CGTCTCTATCGCGCCAGTTCCTCAGCCTCAGTGCTATGAAGGTGACAGCGTGAGGTGACCCATCTGGCCCGCGCGATG

Abbildung 6.1: 5' – flankierende Region des *NDUFV1* – Gens mit möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. TATA – oder CCAAT – Boxen fehlen jedoch. CpG – Elemente sind unterstrichen. (→) Transkriptionsstartpunkt wie mit 5' – RACE bestimmt.

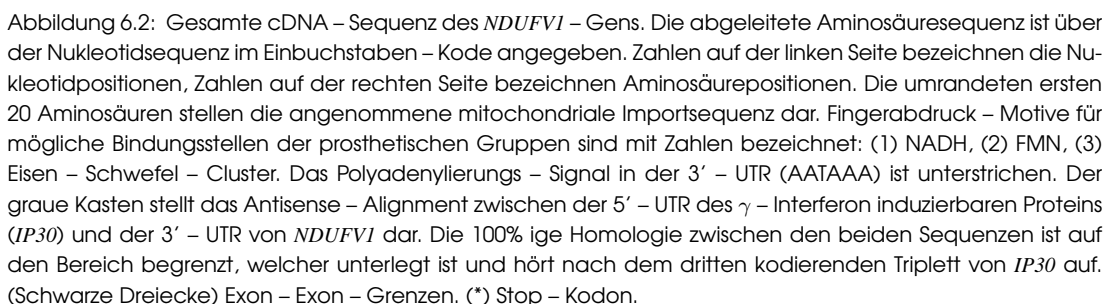
Übergang zu eukaryontischen Zellen die Funktion des Komplexes I feiner abgestimmt und reguliert. Die Folge war die „Addition“ immer weiterer Untereinheiten [60].

Dank dieser phylogenetischen Informationen konnte die Gruppe der Kandidatengene für eine Mutationssuche eingengt werden. Die Entscheidung fiel zunächst auf die 51 kDa – Untereinheit des Komplexes I (*NDUFV1*). Diese Untereinheit stellt mit ihrer Bindungsstelle für  $\text{NADH}_2$  gewissermaßen die Eintrittspforte in den Komplex I dar [48], und ist in der Natur so wichtig, daß selbst *Escherichia coli* ein homologes Gen (*NuoF*) aufweist.

Die Mutationssuche erforderte daher zunächst die Aufklärung der DNA – Sequenz und der Struktur des ausgewählten *NDUFV1* – Gens.

### 6.1.1 Erstbeschreibung der vollständigen cDNA – Sequenz der humanen *NDUFV1* – Untereinheit

Vor Beginn der Arbeit waren nur Teile der cDNA – und genomischen *NDUFV1* – Sequenz bekannt. Diese umfassten die beiden ersten Exone und ein ca. 400 bp langes Fragment am 3' – Ende des Gens [183, 3]. Mittels unterschiedlicher PCR – Techniken konnte ich die gesamte cDNA – und genomische Sequenz des *NDUFV1* – Gens amplifizieren und sequenzieren. Bei der Sequenzierung der cDNA fand sich ein 1450 bp langes Transkript (Abb. 6.2, S. 57). Der Startpunkt der Transkription konnte durch den 5' – RACE bei 69 bp lokalisiert werden. Von diesem Punkt aus finden sich 29 und 70 bp in 3' – Richtung zwei mögliche ATG – Startkodons. Das erste ATG – Triplet wird 5 bp später in 3' – Richtung von einem Stopkodon gefolgt, liegt nicht im Sequenzkontext eines möglichen Translationsstart – Kodons [112] und kommt somit als Startkodon nicht in Frage. Das 70 bp vom Transkriptions – Startpunkt entfernte





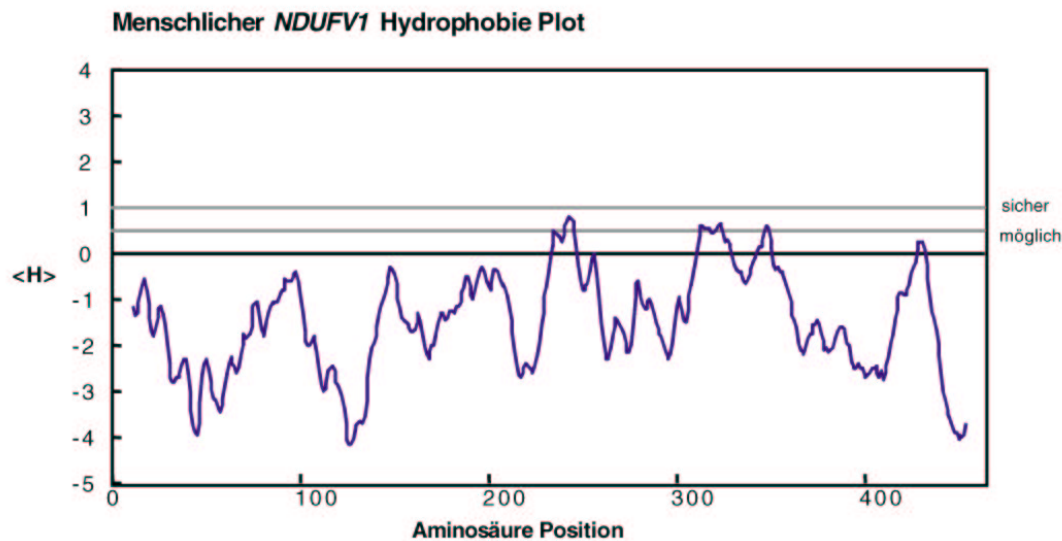


Abbildung 6.3: Hydrophobie – Plot des NDUFV1-Proteins. Die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung für bestimmte Abschnitte der Polypeptidsequenz ist in einer Hydrophobie-Skala (H) angegeben (nach Engelman *et al.*, 1986) (56). Dabei beschreiben negative Werte hydrophile und positive Werte hydrophobe Polypeptidanteile. Abschnitte, die über einen längeren Bereich hydrophob sind, bilden sehr wahrscheinlich eine  $\alpha$  – Helix (0,5-1,0 möglich, >1,0 sicher). Die  $\alpha$  – Helix ist typisch für transmembranöse Proteinabschnitte. Wie aus dem Plot ersichtlich, handelt es sich bei NDUFV1 um ein größtenteils hydrophiles Protein ohne sichere Transmembrandomänen.

te ATG – Triplet befindet sich ein Konsensus – „Kozak“ – Sequenzkontext [(CC)RCCATGG] für einen Translations – Startpunkt und beginnt ein offenes Leseraster von 464 Kodons. Die abgeleitete Polypeptidsequenz ergibt ein rechnerisch 50,8 kDa großes Protein. Der Hydrophobie – Plot (Abb. 6.3, S. 58) weist ein vornehmlich hydrophiles Protein ohne Transmembrandomänen auf. Die Länge der vermuteten mitochondrialen Importsequenz wurde mit dem Programm MITOPROTII theoretisch berechnet und umfaßte die ersten 20 Aminosäuren. Der Algorithmus des Programms funktioniert unter der Annahme, daß Importsequenzen hydrophil sind, in der Regel eine positive Ladung aufweisen und keine sauren Aminosäuren beinhalten. Da die berechnete Größe des Proteins 50.8 kDa beträgt und das native Protein im SDS – PAGE – Gel bei 51 kDa läuft, scheint es, daß bei NDUFV1 die Importsequenz nach Eintritt in die mitochondriale Matrix nicht entfernt wird. In der Polypeptidsequenz finden sich Konsensus – Motive für eine FMN Bindungsstelle (G[AM] – G – [AR] – Y – [LIVM] – C – G – [DE](2) – [STA](2) – [LIM](2) – [EN] – S = Prosite PS00644) und eine Bindungsstelle für Eisen – Schwefel – Kluster (E – S – C – G – x – C – x – P – C – R – x – G = Prosite PS00645), wobei die drei benachbarten Cystein – Seitenketten

|                          |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |
|--------------------------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| <i>Homo sapiens</i>      | 82  | T | S | G | L | R | G | R | G | G | A | G | F | - | P | T | G | L | K | W | S | F | M | N | - | K | P | S | D | G | R   | 109 |
| <i>Aspergillus niger</i> | 93  | A | S | G | L | G | R | G | G | A | G | F | - | P | S | G | L | K | Y | S | F | M | N | F | K | - | - | D | W | D | 119 |     |
| <i>Neurospora crassa</i> | 91  | A | S | G | L | R | G | R | G | G | A | G | F | - | P | S | G | L | K | W | S | F | M | N | F | K | - | - | D | W | D   | 118 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | 105 | K | S | G | L | R | G | R | G | G | A | G | F | S | P | S | G | L | K | W | S | F | M | P | - | K | T | T | D | G | R   | 133 |

Abbildung 6.4: Alignment der menschlichen NDUFV1 – Aminosäuresequenz mit der Sequenz von NADH – Dehydrogenasen weiterer Spezies. Die konservierten Positionen des G – x – G – x – x – G – x(15 – 20) – (DE) Fingerabdruck – Motivs sind grau unterlegt. Die Aminosäuresequenzen der nichthumanen Spezies sind der GenBank entnommen (X56227, X644402, X83999).

mögliche Liganden für das 4Fe – 4S – Cluster darstellen.

Wierenga *et al.* (1986) haben in verschiedenen Dinukleotid – bindenden Proteinen unterschiedlicher Spezies ein gemeinsames  $\beta\alpha\beta$  – Motiv\* entdeckt [218]. Sie leiteten daraus ein Sequenzmotiv ab, in welchem drei invariante Glycin – Positionen zum C – Terminus hin von einer invarianten Asparagin – oder Glutaminsäure – Position gefolgt werden. Dieser „Fingerabdruck“ (G – x – G – x – x – G – x – (15 – 20) – [DE]) kann bei NADH – Dehydrogenasen verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Abb. 6.4). NDUFV1 – Transkripte sind zwar ubiquitär nachweisbar, jedoch in unterschiedlicher Menge (Abb. 6.5). Wie für Gewebe mit hohem Energiebedarf zu erwarten, fanden sich die meisten Transkripte des NDUFV1 – Gens im adulten Herz – und Skelettmuskel, im fetalen Herzmuskel, in diencephalen Strukturen, in der Substantia nigra, in der Niere und Leber. In den peripheren Leukozyten ließen sich nur wenige Transkripte nachweisen.

### 6.1.2 Erstbeschreibung der genomischen Struktur des humanen NDUFV1 – Gens

Die Untersuchung von Restriktionsfragmenten im Southern – Blot bestätigte, daß es sich bei NDUFV1 um eine Einzelkopie handelt und im Gegensatz zu NDUFV2 keine Pseudogene nachweisbar sind [42]. Die relativ geringe Größe der Introns ermöglichte es, die gesamte genomische NDUFV1 – Struktur mit unterschiedlichen PCR – Techniken aufzuklären. Überlappende PCR – Fragmente wurden so aneinander ausgerichtet, daß sie das gesamte Gen umfaßten. Insgesamt fanden sich 10 Exons, deren Exon – Intron Grenzen alle das GT...AG Konsensusmotiv aufweisen. Die Introngrößen va-

\*Das  $\beta\alpha\beta$  – Motiv entspricht einer zwischen zwei  $\beta$  – Faltblättern gelegenen  $\alpha$  – Helix

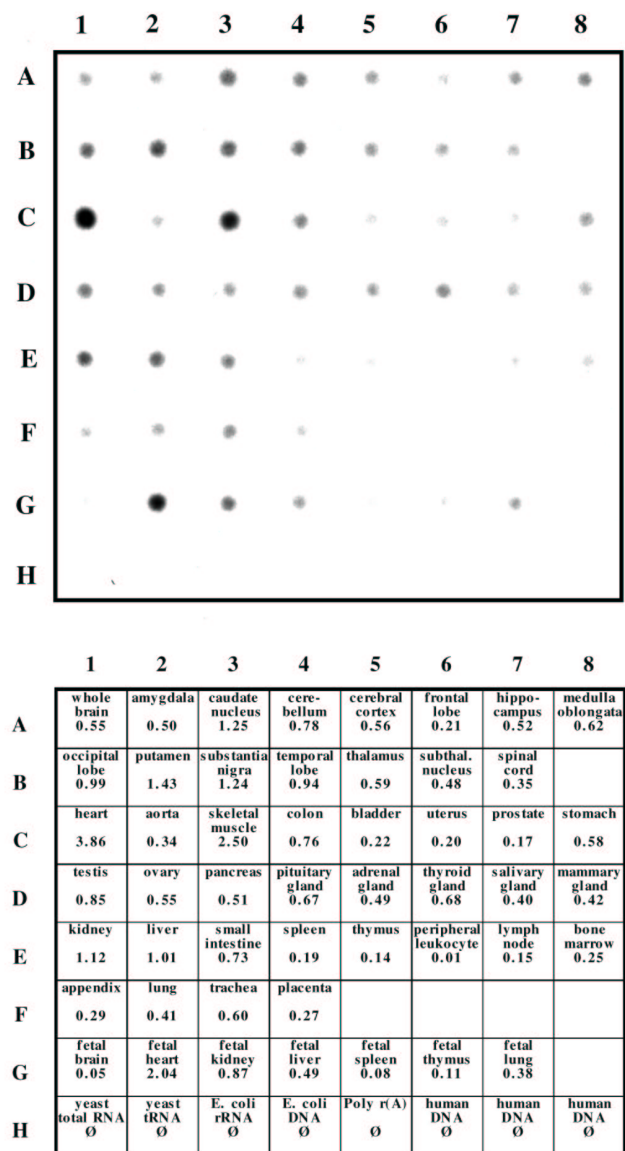


Abbildung 6.5: PolyA<sup>+</sup> – RNA – Punktblot unterschiedlicher adulter und fetaler Gewebe des Menschen (hybridisiert mit einer radioaktiv markierten *NDUFV1* – cDNA – Sonde). Die Ergebnisse der densitometrischen Volumenintegration sind in Einheiten von OD\*mm<sup>2</sup> dargestellt. Die Signalstärke wurde mit einer Ubiquitin – Sonde geeicht. Durch die höhere lineare Sensitivität des Phosphor – Imagers können im niedrigen Intensitätsbereich noch Signale detektiert und deren Intensität berechnet werden, die sich in Graustufen nicht mehr abbilden lassen.

riieren zwischen 73 und 1320 bp (Tabelle 6.1, S. 61). Innerhalb des ersten Introns liegt eine Alu – Sx Sequenz (HSU14574) und eine polymorphe poly(A) – Sequenz. In Intron 4 findet sich eine polymorphe poly(T) – Sequenz. Das Verfahren der ligationsvermittelten einseitigen PCR ermöglichte es, auch die genomische Sequenz vom

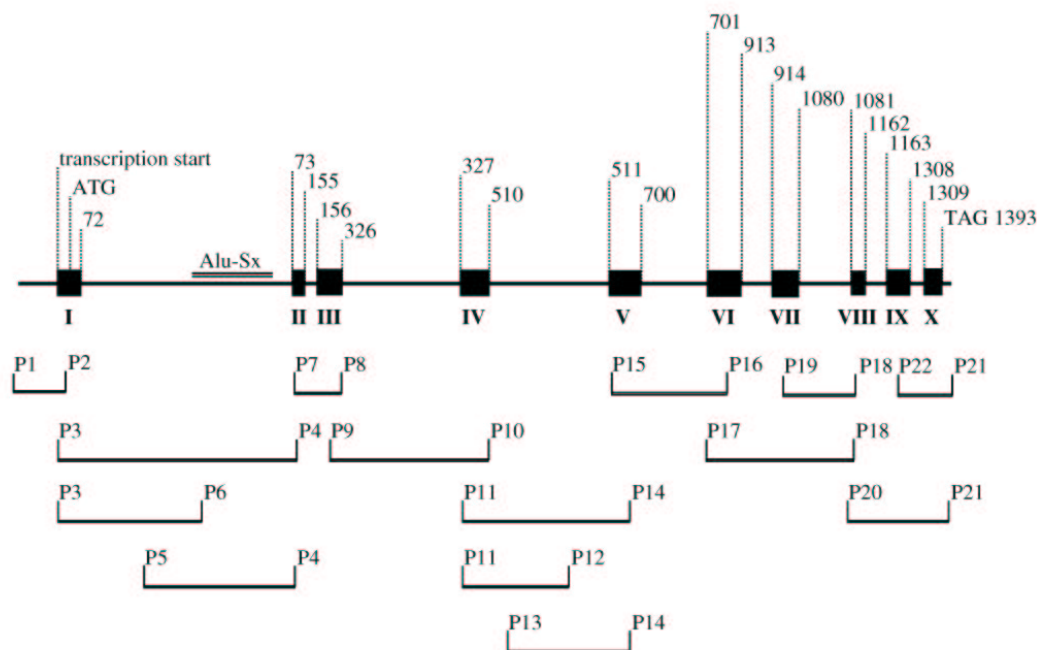


Abbildung 6.6: Genomische Struktur der humanen 51 kDa Untereinheit von Komplex I (*NDUFV1*). Die Zahlen beziehen sich auf die Positionen im offenen Leserahmen der cDNA (Abb. 6.2, S. 57). Das Alu – SX – Element im ersten Intron ist als Doppellinie dargestellt. Die überlappenden PCR-Fragmente, welche zur Bestimmung der genomischen Struktur benutzt wurden, sind als Balken unter der Gendarstellung gezeichnet. Die Primer – Nummern beziehen sich auf Tabelle 5.1, S. 45.

| Exon | nt (cDNA) | 5' Splice-Donor               | Intron Größe | 3' Splice-Akzeptor             |
|------|-----------|-------------------------------|--------------|--------------------------------|
| I    | 1-72      | CGGCGACACG/ <b>gt</b> gaggccc | 1320 bp      | gtctccct <b>ag</b> /ACAGCACCCA |
| II   | 73-155    | ATGACTGGAG/ <b>gt</b> gagacag | 73 bp        | ttctgtcc <b>ag</b> /GCTGAAAGGT |
| III  | 156-326   | CAGATGGCAG/ <b>gt</b> gtgtgtg | 730 bp       | gcccctgc <b>ag</b> /GCCCAAGTAT |
| IV   | 327-510   | CAATCTGCAG/ <b>gt</b> gggtagg | 745 bp       | tgtcctgc <b>ag</b> /GTGGCCATCC |
| V    | 511-700   | GCAGACGTGG/ <b>gt</b> aaggcct | 424 bp       | ttccctga <b>ag</b> /GAGTGTTTGG |
| VI   | 701-913   | AAGCATGCTG/ <b>gt</b> aaggcct | 195 bp       | ggggcccc <b>ag</b> /GGGGTGTAC  |
| VII  | 914-1080  | GGACCGCTCG/ <b>gt</b> aagggtt | 327 bp       | cgtcacc <b>ag</b> /ACGGACATCG  |
| VIII | 1081-1162 | TGCCGTGAGG/ <b>gt</b> gagcatc | 141 bp       | gtggetgc <b>ag</b> /GTGTGGACTG |
| IX   | 1163-1308 | GCCTGTGCAG/ <b>gt</b> attcacc | 106 bp       | ccgacccc <b>ag</b> /GGTCTGATCC |
| X    | 1309-1392 |                               |              |                                |

Tabelle 6.1: Intron – Exon – Grenzen des *NDUFV1* – Gens. Großbuchstaben bezeichnen Exon – Sequenzen und Kleinbuchstaben Intron – Sequenzen. Die gesamte genomische Sequenz wurde in der GenBank unter der Zugriffsnummer AF053069 abgelegt. Die Nukleotid – Positionsnummern beziehen sich auf den offenen Leserahmen der cDNA – Sequenz (Abb. 6.2, S. 57 oder GenBank AF053070).

Transkriptions – Startpunkt aus in 5' – Richtung aufzuklären (Abb. 6.1, S. 56). In diesem Sequenzstück fehlen die üblichen Motive für TATA oder CCAT – Boxen. Das Fehlen dieser Regulationsmotive wurde bereits bei einigen nukleär kodierten Untereinheiten der Komplexe I und IV beschrieben [80, 213, 172].

Zwischen den Basenpaaren -258 und -253 fand sich eine Konsensus – Sequenz (MG-GAAG) für die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NRF – 2 (nuclear respiratory factor 2). NRF – 2 scheint die Transkription verschiedener nukleär kodierter Gene zu regulieren, welche später in das Mitochondrium importiert werden. Dasselbe Konsensus – Motiv findet sich in der 5' – Region einiger nukleär kodierter Untereinheiten der mitochondrialen Cytochrom c Oxidase, der  $\alpha$  – Untereinheit der ATP – Synthase und des mtTFA (mitochondrial transcription factor A) [208].

Das Auftreten dieses Konsensus – Motivs wurde von mir erstmals in einem der Komplex I – Gene beschrieben [169]. Die funktionelle Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für *NDUFV1* muß jedoch noch in einem Reportergen – oder einem Bandshift – Assay nachgewiesen werden.

Zusätzlich zum NRF – 2 Bindungsmotiv fanden sich noch potentielle GC – Elemente ( – 168 bis – 163 bp) und eine GATA – Box ( – 134 bis – 131 bp). Eine Analyse der Verteilung von CpG – Motiven ergab, daß sich 97 aus 185 (52%) aller im Gen vorhandenen CpGs in der Nähe des Transkriptions – Startpunktes befinden. Dies bedeutet, daß der Transkriptions – Startpunkt im Bereich einer CpG – Insel liegt, was mit der „Housekeeping“ – Funktion von *NDUFV1* gut vereinbar ist.

### 6.1.3 Bedeutung der Homologie zwischen *NDUFV1* und dem Gen des $\gamma$ – Interferon – induzierbaren Proteins (*IP30*)

Die *NDUFV1* – Untereinheit von Komplex I ist zwischen verschiedenen Spezies konserviert und zeigt auch zwischen Eu – und Prokaryonten eine hohe Homologie [150]. Daher erstaunt die Homologie von 96.9% zwischen Mensch und Rind wenig. Überraschenderweise fand sich eine 100%ige Antisense – Homologie zwischen dem 3' – UTR von *NDUFV1* und der 5' – UTR (einschließlich der ersten zwei Kodons) des Gens für das  $\gamma$  – Interferon induzierbare Protein (*IP30*) (GenBank J03909). Verfolgt man die Sequenz des *IP30* – Gens weiter in 3' – Richtung, verliert sich die Homologie zu *NDUFV1* (Abb. 6.2, S. 57). Die Funktion des *IP30* ist nicht bekannt. Seine cDNA wurde kloniert [128] und ist in vielen Geweben nachweisbar. Eine hohe Repräsentanz von 1.3% findet sich in einer Lungen – cDNA – Bibliothek (UniGene Hs.119114).

Seine Transkription wird durch  $\gamma$  – Interferon (IFN –  $\gamma$ ) stimuliert. Das Polypeptid IFN –  $\gamma$  wird primär von aktivierten Lymphozyten freigesetzt und löst die zahlreichen Erscheinungen einer verzögerten Immunantwort aus. Darüber hinaus besitzt es anti-proliferative Eigenschaften. Es interagiert mit einem Plasmamembran – Rezeptor und kann dadurch die Expression von Genen modulieren, welche an der Immunantwort beteiligt sind. In einigen Fällen induziert IFN –  $\gamma$  die Transkription direkt (HLA Klasse I und II Gene), in anderen Fällen sind zusätzliche Mediatoren für die Induktion erforderlich. IP30 könnte z.B. solch ein Mediator in der IFN –  $\gamma$  – Reaktionskaskade sein. Natürliche Antisense – Nukleotide können die Genexpression regulieren und wurden bereits bei prokaryontischen und eukaryontischen Geninteraktionen beschrieben [111]. Man kann daher annehmen, daß die 3' – UTR von *NDUFV1* aufgrund der oben beschriebenen Antisense – Homologie ein natürlicher Suppressor der IP30 – Translation sein könnte. Hybridisieren die beiden Stränge miteinander, wie in Abb. 6.7 dargestellt, kann das Ribosom nicht mehr an die 5' – UTR von IP30 binden und bis zum Startkodon scannen: die IP30 – Translation wird unterbunden.

Aufgrund der drei folgenden Argumente scheint die Verbindung zwischen *NDUFV1* und IP30 mehr als rein zufällig zu sein:

1. Die 100%ige Homologie von 48 bp zwischen den beiden Strängen besteht, obwohl beide Gene auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Chr11 und Chr9).

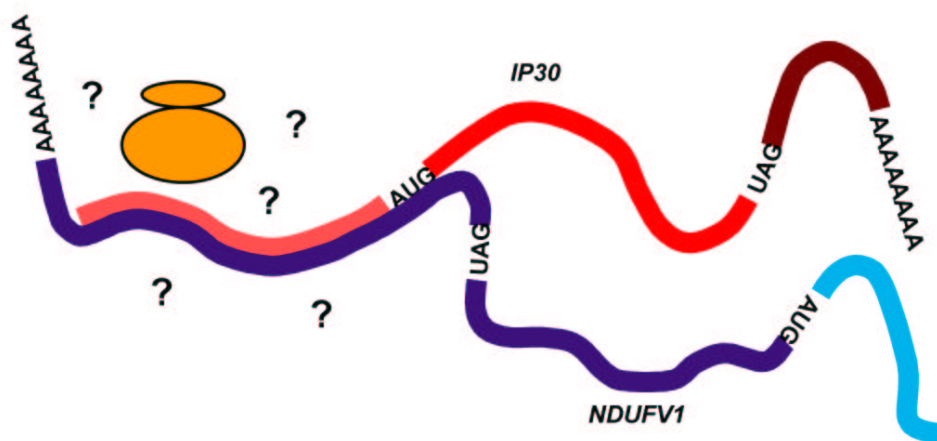


Abbildung 6.7: Hypothetische Auswirkung der Antisense – Homologie der *NDUFV1* – mRNA auf die Translation des IFN –  $\gamma$  induzierbarem Proteins (*IP30*): Durch Blockierung der 5' – UTR der *IP30* – mRNA nach Anlagerung der 3' – UTR der *NDUFV1* – mRNA könnte das Ribosom (gelb) nicht mehr an der 3' – UTR der *IP30* – mRNA bis zum Startkodon entlanglaufen. Eine Translation des IP30 – Proteins bliebe somit aus.



2. Die Homologie beschränkt sich nur auf die 5' – UTR und die ersten beiden Kodons von IP30. Genau diese Sequenzanteile sind an der Ribosomenbindung und am Translations – Start beteiligt.
3. Die homologe Region ist nicht Teil einer repetitiven Alu – Sequenz.

*NDUFV1* – Transkripte könnten daher besonders in Geweben mit hohem Energie – und Sauerstoffbedarf eine Immunantwort unterdrücken. In diesen Geweben fallen bei der oxidativen Phosphorylierung über die Atmungskette viele Sauerstoff – Radikale an, deren entzündungsfördernde Wirkung gut belegt ist [29, 189, 37]. Tatsächlich gibt es Fallberichte, in denen ein Komplex I – Mangel mit entzündlichen Veränderungen wie Myositis oder Enzephalomyelitis einhergeht [227].

#### **6.1.4 Erstbeschreibung von Mutationen des *NDUFV1* – Gens bei Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel.**

Insgesamt wurden 30 Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel untersucht. Die biochemischen Untersuchungsergebnisse der 4 Patienten mit Mutationen im *NDUFV1* – Gen sind in den Tabellen 6.2, S. 66 und 6.9, S. 102 dargestellt.

Die Screeninguntersuchungen wurden an mRNA aus gezüchteten Patientenfibroblasten durchgeführt. Nach Umschreibung der mRNA in cDNA wurde das gesamte *NDUFV1* – Gen PCR – amplifiziert und mit geschachtelten Primern bidirektional automatisch sequenziert.

Bei vier Patienten fanden sich neue Mutationen, die entweder zum Austausch einer konservierten Aminosäure oder zu einem vorzeitigen Kettenabbruch (Stopmutation) führten. Die Pathogenität der Missense – Mutationen ließe sich an knockout – Mausmodellen mit den jeweiligen Mutationen und entsprechendem Funktionsverlust des Komplexes I am besten nachweisen. Da dies aufgrund des beträchtlichen Aufwandes nur für maximal eine ausgewählte Mutation möglich ist, wird in der Regel die Erfüllung der allgemein anerkannten Pathogenitätskriterien von Cotton & Scriver (1998) gefordert [38]. Diese sind:

1. eine Genotyp – Phänotyp – Kosegregation,
2. ein Ausschluß der Mutation in 200 Allelen gesunder Kontrollpersonen,
3. eine hohe evolutionäre Konservierung der mutierten Aminosäure,
4. und eine Analyse des gesamten offenen Leserasters des entsprechenden Gens.

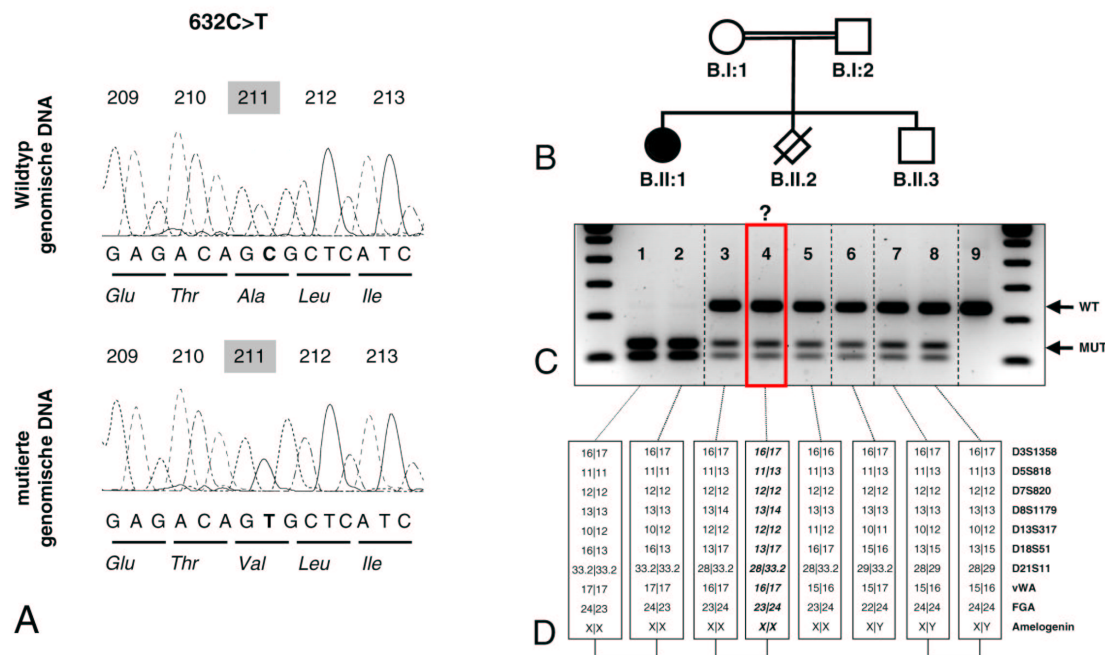


Abbildung 6.8: (A) Nachweis der 632C→T Mutation bei Familie B (Kasuistik, S. 31). Die Mutation liegt bei der Indexpatientin homozygot vor und führt zu einem Austausch von Alanin gegen Valin in der hochkonservierten FMN – Bindungsdomäne. (B) Stammbaum der konsanguinen Familie B. (C) Analyse genomischer DNA: RFLP – Nachweis der 632C→T Mutation. Belegung der Elektrophoresespuren: Die untersuchte DNA stammt aus (1) gezüchteten Fibroblasten und aus (2) Muskel der Indexpatientin, aus (3) peripheren Lymphozyten der Mutter, aus (4) gezüchteten Chorionzellen der zweiten Schwangerschaft, vom (5) abgetriebenen Fetus, aus (6) peripheren Blutlymphozyten des Vaters, aus (7) nativen und (8) gezüchteten Chorionzellen der dritten Schwangerschaft. (9) Normalkontrolle. (D) Längenpolymorphismen zehner unterschiedlicher Marker. Die Linien unter den Haplotypbalken verbinden identische Haplotypen. Man sieht den deutlichen Unterschied zwischen den Balken 4 und 5. wt = Wildtyp, mut = Mutante.

Diese Pathogenitätskriterien sind für die Missense – Mutationen 632C→T, 1268C→T und 1022C→T alle erfüllt. Darüber hinaus wurden auch die häufigsten Punktmutationen und Deletionen in der mitochondrialen DNA der Patienten ausgeschlossen. Die vier Mutationen des Gens werden nun im einzelnen diskutiert.

**Mutation 632C→T (Ala211Val):** Die cDNA – Sequenzierung der Indexpatientin aus Familie B (Kasuistik S. 31, biochemische Befunde S. 102) ergab eine homozygote C→T Mutation an Position nt632. Die Homozygotie konnte auf genomischer DNA – Ebene mittels Restriktionsfragmentanalyse bestätigt werden. Die Mutation führt zu einem Austausch von Alanin zu Valin an Position 211 der Polypeptidkette (Ala211Val). Das Alanin an dieser Position liegt in einem vom Menschen bis zu *Escherichia coli* hochkonservierten Proteinbereich, welcher die FMN-bindende Domäne von NDUFV1



bildet (Abb. 6.11, S. 69). Die gesunden Eltern der Indexpatientin sind heterozygot für diese Mutation.

Eine Diskrepanz zwischen biochemischem und molekulargenetischem Befund ergab sich für den abgetriebenen Fötus (B.II:2) der zweiten Schwangerschaft. Diese Diskrepanz ist nicht allein mit dem mütterlichen Haplotyp der gezüchteten Chorionzellen erklärt, wie in Abschnitt 6.4 noch zu erläutern ist. Biochemische Messungen hatten in den gezüchteten Chorionzotten dieser Schwangerschaft einen isolierten Komplex I – Mangel ergeben, wohingegen das Muskelgewebe des später abortierten Fötus normale Komplex I – Aktivitäten aufwies. Letzterer Befund wäre im Einklang mit der Heterozygotie für die Mutation. Ein jüngerer Bruder der Indexpatientin ist ebenfalls heterozygot und gesund (aktuelles Alter 2 Jahre). Die Mutation wurde in 280 Allelen gesunder Kontrollpersonen nicht gefunden.

**Mutationen 175C→T (Arg59Stop) und 1268C→T (Thr423Met):** Die initiale Mutationssuche auf cDNA – Ebene bei den betroffenen Patienten der Familie C (Kasuistik S. 32, biochemische Befunde S. 66) ergab eine scheinbar homozygote C→T Mutation an Position nt1268. Diese Mutation führt zu einem Austausch von Threonin zu Methionin an Position 423 der Polypeptidkette (Thr423Met). Diese Aminosäure erscheint funktionell wichtig, da sie von *Escherichia coli* bis zum Menschen konserviert ist (Abb. 6.11 auf S. 69). Die Homozygotie dieser Mutation konnte aber auf genomischer DNA – Ebene nicht bestätigt werden. Sowohl bei den betroffenen Brüdern als auch bei der Mutter lag diese Mutation heterozygot vor, beim Vater fand sie sich nicht. Unter der Vermutung, daß es sich beim Vater um eine Promotor – oder Intronmutation handeln könnte, wurde das gesamte väterliche Gen mit allen Introns und Exons sowie

|                | Material | Komplex I | Komplex II+III |     | Komplex IV  |      |              |
|----------------|----------|-----------|----------------|-----|-------------|------|--------------|
| Familie C      |          |           |                |     |             |      |              |
| Patient C.II:1 | Muskel   | 62        | (84-273) †     | 280 | (200-470) † | 800  | (520-2080) † |
| Patient C.II:2 | Muskel   | 76        | (84-273) †     | 316 | (200-470) † | 1350 | (520-2080) † |
| Familie D      |          |           |                |     |             |      |              |
| Patient D.II:1 | Muskel   | 40        | (84-273) †     | 340 | (200-470) † | 1030 | (520-2080) † |

Tabelle 6.2: Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe der Patienten aus den Familien C und D. † Ergebnisse dargestellt als mU/U Citratsynthase – Aktivität. Die Normwerte sind nicht normalverteilt, daher ist hinter jedem Meßwert der 5-95 Perzentilenbereich des Normalkollektivs angegeben.

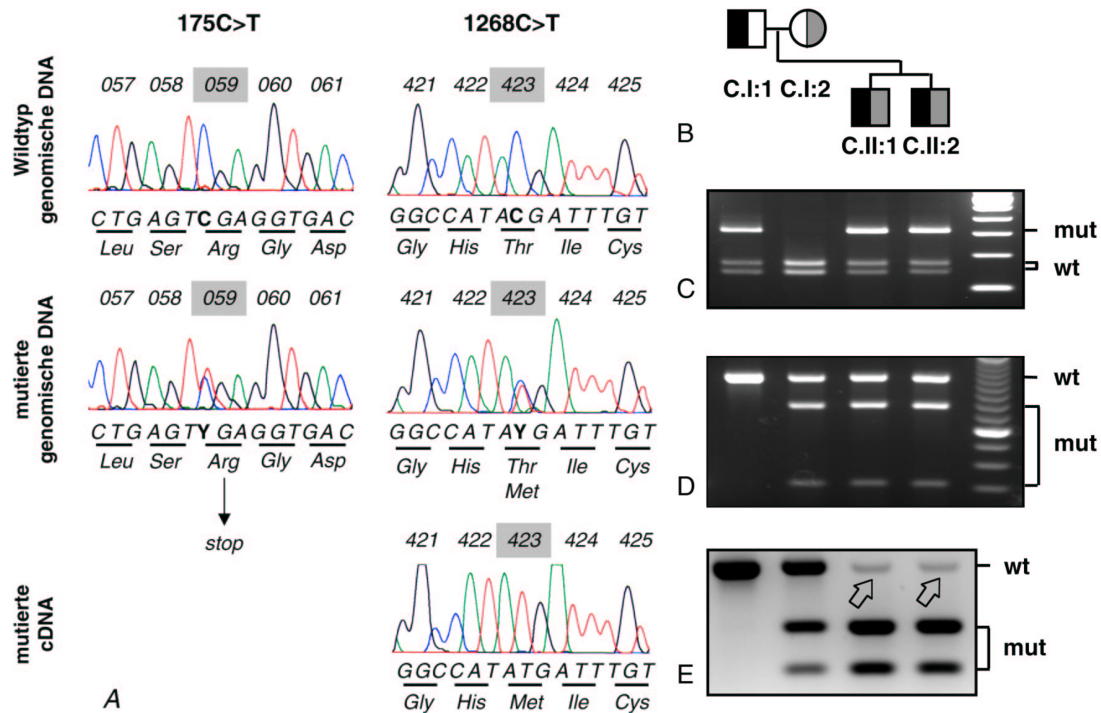


Abbildung 6.9: (A) Nachweis der 175C→T und 1268C→T Mutationen bei Familie C (Kasuistik, S. 32). Die 1268C→T Mutationen erscheint auf cDNA – Ebene homozygot, da die mRNA – Kopien des anderen Allels mit Stopmutation durch nonsense mediated messenger decay (NMD) eliminiert wurden. (B) Stammbaum der Familie C. (C) Analyse der genomischen DNA: RFLP – Nachweis der heterozygoten 175C→T Mutation beim Vater und bei beiden Söhnen. (D) Analyse der genomischen DNA: RFLP – Nachweis der heterozygoten 1268C→T Mutation bei der Mutter und bei beiden Söhnen. (E) Analyse der cDNA: quantitative Restriktionsanalyse radioaktiv markierter DNA. Die Transkripte des väterlichen Allels mit der Stop – Mutation stellen sich aufgrund des nonsense mediated messenger decay nur schwach dar (offene Pfeile). mut = mutierte DNA, wt = Wildtyp – DNA

der 350 bp Promotorsequenz sequenziert. Dabei fand sich eine heterozygote Stopmutation (CGA→TGA) an Position 175. Diese Stopmutation verkürzt die Polypeptidkette um 91% und führt so zu einer funktionslosen Untereinheit. Der Einbau einer erheblich verkürzten Proteinuntereinheit kann darüber hinaus noch zur Dysfunktion des Gesamtkomplexes führen, da seine Gesamtstabilität beeinträchtigt wird. Um diesen dominant negativen Effekt auszugleichen, wäre es für die Zelle „biologisch sinnvoll“, mRNAs mit vorzeitigen Stopmutationen zu eliminieren. Tatsächlich existiert ein solcher Mechanismus, der als NMD (nonsense mediated messenger decay) bezeichnet wird. Thermann *et al.* (1998) haben diesen Mechanismus genauer untersucht und herausgefunden, daß NMD meist dann eintritt, wenn das vorzeitige Stopcodon noch vor einem zu spleißenden Intron liegt [187]. Diese Bedingung ist beim Vater gegeben, da die 175C→T Mutation bereits im Exon 2 auftritt und entsprechend viele Introns folgen. Mittels einer empfindlicheren Detektionsmethode (Restriktionsanalyse mit radioaktiv

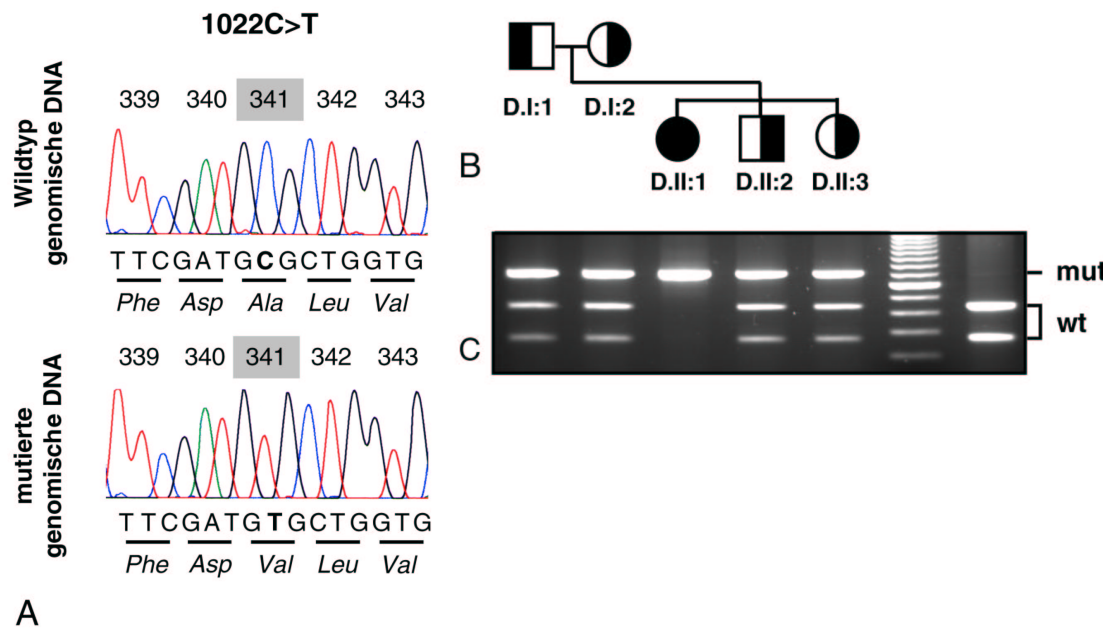


Abbildung 6.10: (A) Nachweis der 1022C→T Mutation bei Familie D (Kasuistik, S. 32). (B) Stammbaum der Familie D. (C) Analyse genomischer DNA: RFLP – Nachweis der heterozygoten 1022C→T Mutation bei beiden Eltern und Geschwistern. Die Indexpatientin trägt die Mutation homozygot. Auf der rechten Seite ist eine gesunde Kontrollperson zum Vergleich aufgetragen. mut = mutierte DNA, wt = Wildtyp – DNA

markierten PCR – Fragmenten) konnte ich nachweisen, daß die mRNA des väterlichen Allels bei beiden Patienten vorhanden war, jedoch in stark reduzierter Menge. Dies führte dazu, daß die 1268C→T Mutation auf cDNA – Ebene scheinbar homozygot vorlag. Die Mutation wurde in 200 Allelen gesunder Kontrollpersonen nicht gefunden. Für die 175C→T Stopmutation erübrigte sich das Screening 200 normaler Allele.

**Mutation 1022C→T (Ala341Val):** Die cDNA-Sequenzierung der Indexpatientin aus Familie D (Kasuistik S. 32, biochemische Befunde S. 66) ergab eine homozygote C→T Mutation an Position nt1022. Die Homozygotie konnte bei der Indexpatientin auf genomischer DNA – Ebene bestätigt werden. Sowohl die Eltern als auch beide gesunde Geschwister sind heterozygot. Die Mutation führt zu einem Austausch von Alanin zu Valin an Position 341 der Polypeptidkette (Ala341Val). Das Alanin an dieser Position ist vom Menschen bis zur Kartoffel (*Solanum tuberosum*), jedoch nicht bis zu *Escherichia coli* konserviert (Abb. 6.11, S. 69). Diese relativ „milde“ Mutation könnte die Ausprägung des Phänotyps der Patientin erklären. Von allen Patienten mit

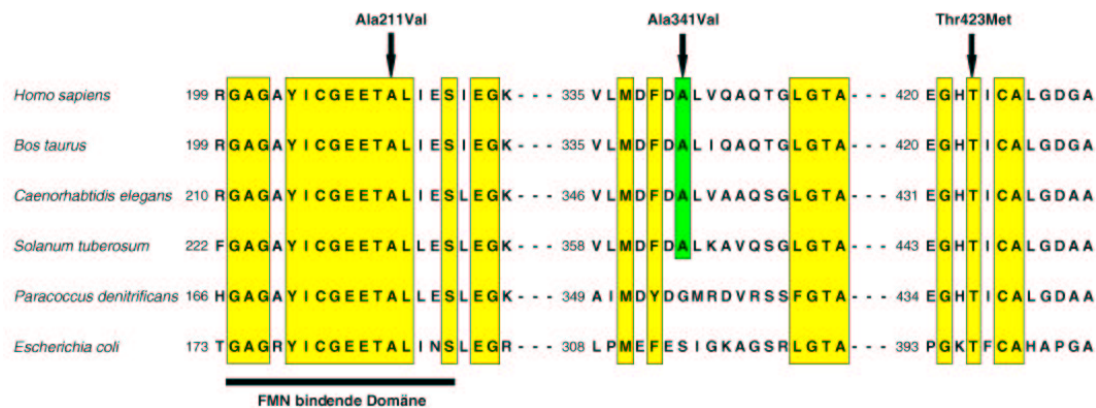


Abbildung 6.11: Alignment der NADH – Dehydrogenasen unterschiedlicher Spezies. Die Missense – Mutationen (Pfeile) liegen in konservierten Domänen des Proteins. Die Ala211Val – Mutation liegt im Bereich der FMN – bindenden Domäne, die vom Menschen bis zu Bakterien streng konserviert ist. Das Gleiche gilt für die Thr423Met – Mutation, die sich in einem zwischen pro – und eukaryontischen Zellen streng konservierten Sequenzmotiv befindet (G – x – T – x – CA – x(7) – P – x – Q). Dieses Motiv findet sich nur in NADH – Dehydrogenasen des aeroben Stoffwechsels und stellt daher sehr wahrscheinlich eine wichtige funktionelle Domäne des Proteins dar. Die Ala341Val – Mutation liegt dagegen „nur“ in einer bis zur Kartoffel konservierten Aminosäureposition. Dies könnte den relativ „milden“ Phänotyp der Indexpatientin aus Familie D erklären. Die Genbank – Zugriffsnummern der Sequenzen sind (von oben nach unten): AF053070, M58607, Z50109, X83999, X64402 und AE000317.

*NDUFV1* – Mutationen ist sie die einzige, die älter als zwei Jahre geworden ist. Die Mutation wurde in 200 Allelen gesunder Kontrollpersonen nicht gefunden.

### 6.1.5 Variabilität des klinischen Phänotyps bei unterschiedlichen Mutationen in Komplex I – Untereinheiten

Inzwischen wurden bei Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel weitere Mutationen in nukleär kodierten Untereinheiten des Komplexes I publiziert. Diese fanden sich in den *NDUFS4* –, *NDUFS7* – und *NDUFS8* – Untereinheiten und werden nun genauer beschrieben, um die Variabilität des Phänotyps zu illustrieren:

*NDUFS4*: Ein achtjähriger Junge wurde im Alter von 8 Monaten mit schwerem Erbrechen, Muskelhypotonie und Dystrophie vorgestellt. Ab dem Alter von 13 Monaten traten epileptische Anfälle, Bradypnoe und Areflexie hinzu. Das Kind verstarb im Alter von 16 Monaten an Herz-Kreislaufversagen. Die Laktatwerte im Liquor und im Serum waren normal. Im Schädel – MRT fanden sich eine generalisierte Hirnatrophie und symmetrische Signalintensitätserhöhungen in der T<sub>2</sub> – Wichtung im Bereich der Basalganglien. Die Mutationsanalyse in *NDUFS4*

ergab eine 5 b – Insertion im 3' – Ende des Gens. Die Funktion der NDUFS4 – Untereinheit ist nicht geklärt. Es besteht eine 91%ige Homologie zwischen Mensch und Rind. Die Mutation liegt im Bereich eines Konsensusmotivs (Arginin – Valin – Serin) für eine Phosphorylierungsstelle [204].

*NDUFS7*: Das Kind fiel im Alter von 11 Monaten mit unstillbarem Erbrechen auf. Ab dem Alter von 3 Jahren entwickelte es eine linksseitige Hemiplegie und Dysarthrie. Darüber hinaus fiel eine Kussmaul'sche Atmung auf. Wiederholte Laktatmessungen in Serum und Liquor waren normal. Im Schädel – MRT wurden bilaterale Läsionen im Putamen, Nucleus caudatus und Nucleus dentatus gefunden. Der Patient verstarb im Alter von 5 Jahren. Die Mutationssuche in *NDUFS7* ergab eine homozygote Mutation (Val112Met), die das Bindungsmotiv eines Eisen – Schwefel – Clusters zerstört. Die genaue Funktion der Untereinheit im Gesamtkomplex ist nicht gesichert. Sie scheint essentiell zu sein, da ein Protein (*NuoB*) mit hoher Homologie schon bei *Escherichia coli* existiert [196].

*NDUFS8*: Der Säugling fiel im Alter von fünf Wochen mit Apnoen, Zyanoseanfällen, Muskelhypotonie und einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie auf. In der Computertomographie des Schädels fand sich eine ausgedehnte Hypodensität im Bereich der weißen Substanz und hypodense Bezirke im Putamen und im Mesenzephalon. Laktat im Serum und im Liquor waren erhöht. Das Kind verstarb im Alter von 11 Wochen an einem HerzKreislaufversagen. Die Mutationsanalyse in *NDUFS8* ergab zwei compound – heterozygote Mutationen (Pro79 Leu und Arg102His) [126]. *NDUFS8* ist zwischen prokaryontischen und eukariontischen Zellen hochkonserviert. Aufgrund des Nachweises zweier Eisen – Schwefel – Cluster im *NDUFS8* – Gen liegt die Vermutung nahe, daß diese Untereinheit am Elektronentransport beteiligt ist. Albracht *et al.* (1997) konnten experimentell zeigen, daß *NDUFS8* eine wichtige Rolle bei der Reduktion von Ubichinon und beim Protonentransport spielt [2]. Darüber hinaus existiert ein homologes Protein bei *Rhodobacter capsulatus* (*NuoI*), das eine wichtige Rolle beim Zusammenbau des Gesamtkomplexes spielt [32].

Betrachtet man die klinischen Phänotypen der Patienten, fällt eine große Heterogenität bezüglich Erkrankungsschwere, Symptomkonstellation und klinischem Verlauf auf. Dies überrascht umso mehr, als seitens der biochemischen Gesamtfunktion immer nur Komplex I betroffen ist. Selbst Patienten mit Mutationen in der gleichen Komplex I – Untereinheit (*NDUFV1*) variieren in der Symptomatik zwischen früh letaler

Laktatazidose und einem protrahierten Verlauf mit Leukenzephalopathie und Myoklonusepilepsie. Folgende mögliche Erklärungen bieten sich an:

**These 1:** *Die Zusammensetzung von Komplex I variiert hinsichtlich der beteiligten Untereinheiten zwischen den Mitochondrien unterschiedlicher Gewebe.* Bentlage *et al.* (1996) konnten bei einem Patienten mit Komplex I – Mangel zeigen, daß sich die Residualaktivitäten des Muskels und der Fibroblasten deutlich unterscheiden. Der Patient wies außerdem einen Komplex IV – Mangel im Muskel auf, der sich trotz wiederholter Messungen in den Fibroblasten nicht bestätigen ließ [17].

Der Grund für diese Diskrepanz ist bisher nicht geklärt. Denkbar ist, daß manche Untereinheiten gewebsspezifische Isoformen aufweisen. Für Komplex I – Untereinheiten konnte dies experimentell nicht bestätigt werden. Für Komplex IV existieren Isoforme, die nur im Herz- und Skelettmuskel exprimiert werden (COXVIaH, COXVIIaH und COXVIIIH)[213]. Die Beobachtung, daß Komplex IV – Isolate aus Leber und Skelettmuskel unterschiedliche kinetische Eigenschaften aufweisen, führte zu der Hypothese, daß Isoformen die Funktion des Holoenzym an die gewebsspezifischen Energiebedürfnisse anpassen [96].

**These 2:** *Einige Komplex I – Untereinheiten werden durch gewebsspezifische Kinasen und Phosphatasen unterschiedlich reguliert:* Scacco *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die Phosphorylierung der NDUF54 – Untereinheit zu einem zwei – bis dreifachen Anstieg der Komplex I – Aktivität in Mausfibroblasten führte [164]. Man darf vermuten, daß die Aktivität von Komplex I beim Menschen ebenfalls auf diese Weise durch gewebsspezifische Kinasen und Phosphatasen reguliert werden kann, welche auf abfallende intracytoplasmatische cAMP – Spiegel reagieren. Da die Aktivität dieser Regulationsenzyme zwischen den Geweben erheblich variiert, würden sich Mutationen in Regulationseinheiten des Komplexes I in verschiedenen Geweben unterschiedlich auswirken.

**These 3:** *Komplex I wird selektiv durch andere Gendefekte in Mitleidenschaft gezogen.* In den letzten Jahren wurden zahlreiche Erkrankungen beschrieben, bei denen die Zunahme des oxidativen Stresses zu einer sekundären Schädigung der Atmungskettenkomplexe und besonders des Komplexes I führt. Hierzu zählen die Friedreich Ataxie, der Morbus Parkinson und der Morbus Wilson [163, 173]. Entsprechend seiner Funktion der Sauerstoffoxidation, in deren Prozeß zahlreiche Radikale anfallen, toleriert Komplex I eine relativ hohe Radikalkonzentra-



tion, ohne Schaden zu nehmen. Steigt die Radikalanflutung jedoch an, wie dies durch mangelnde Entgiftung bei  $\text{Fe}^{2+}$  – Überladung (Morbus Friedreich) oder bei  $\text{Cu}^{2+}$  – Überladung (Morbus Wilson) der Fall ist, kommt es ab einer Schwelle durch Oxidation der Eisen – Schwefel – Cluster zur raschen Komplex I – Inaktivierung [14]. Es wäre somit denkbar, daß die gewebspezifische Aktivität von Peroxidasen Einfluß auf das Ausmaß der Komplex I – Schädigung haben kann.

**These 4:** *Mutationen in Komplex I – Assembly – Genen.* Obwohl fast alle strukturellen Komplex I – Untereinheiten untersucht wurden, konnten nur bei jedem vierten Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel Mutationen nachgewiesen werden [194, 193, 124, 125, 195]. Man kann vermuten, daß auch Proteine, die am Zusammenbau des Gesamtkomplexes oder am Import der Vorläuferpeptide beteiligt sind, pathogenetisch bedeutsam sind. Solche Komplex I – Assembly – Proteine oder Chaperonine sind bereits bei *Neurospora crassa* beschrieben [105, 171]. Humane Homologa sind unbekannt und ein attraktives Ziel der Gen – und Mutationssuche. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß bei Patienten mit isoliertem Komplex IV – Mangel bisher keine Mutationen in nukleär kodierten Untereinheiten gefunden wurden [89], sondern nur in Assembly – Proteinen. Diese sind SCO<sub>2</sub> (ein Kupfer – transportierendes Protein [148]), SURF1 (ein Protein, dessen Wirkmechanismus noch nicht verstanden ist, das jedoch zum Assembly des Gesamtkomplexes benötigt wird [226, 191]) und COX10 (eine Häm A: Farnesyltransferase, welche die Konversion des Protohäms zu Häm A katalysiert. Häm A ist eine prosthetische Gruppe der Cytochrom c Oxidase [203].).

## 6.2 Untersuchungen an 33 Patienten mit mitochondrialem Komplex III – Mangel

### 6.2.1 Komplex III – Mangel: der klinische Phänotyp

Der Atmungsketten-Komplex III – Mangel ist eine seltene Erkrankung. Bisher wurden weltweit etwa 30 Patienten vorwiegend in Einzelkasuistiken oder in kleinen Gruppen beschrieben. Dabei zeigte sich, daß der klinische Phänotyp und das Manifestationsalter der Erkrankung sehr variabel sind [138, 103]. Auch in dieser Untersuchung konnte die klinische Variabilität bestätigt werden. Aufgrund der Anzahl der Patienten bestand jedoch die Hoffnung, Gruppen zu bilden und häufigere Symptomenkomplexe herausarbeiten zu können.

Bei der überwiegenden Anzahl der Patienten (73%, n=24) lag das Manifestationsalter vor dem vierten Lebensjahr, bei 18% (n=6) lag es zwischen dem 5. und 18. Lebensjahr und bei 9% (n=3) im Erwachsenenalter. Der Komplex III – Mangel ist nicht geschlechtswendig (54% männlich, 46% weiblich). Dies steht im Gegensatz zum isolierten Komplex I – Mangel und zum Pyruvatdehydrogenase – Mangel, bei denen das männliche Geschlecht signifikant häufiger betroffen ist [124, 179, 151].

12% (n=4) der früh betroffenen Patienten wiesen ein Leigh – Syndrom auf. Von diesen Patienten verstarben drei noch vor dem vierten Lebensjahr. Einer dieser Patienten ist inzwischen 18 Jahre alt, weist eine ausgeprägte Ataxie und Choreoathetose auf, kann aber noch selbst laufen.

Bei 12% (n=4) der Patienten fanden sich Hirnfehlbildungen. Dies waren Kleinhirn – und Balkenhypoplasie, Pachygyrie, septooptische Dysplasie und eine isolierte Atrophie des Nervus opticus.

Bei 43% (n=14) der Patienten manifestierte sich die Erkrankung mit einer Myopathie, bei 21% (n=7) mit einer Enzephalopathie (Bewußtseinsstörung oder Myoklonusepilepsie) und bei 30% (n=10) mit einer Kombination beider. Der überwiegende Anteil der Patienten (78%, n=26) wies eine Multiorganbeteiligung auf (1 bis maximal 6 Symptome; Median 3), wobei in fallender Häufigkeit zusätzlich Sehstörungen bis zur Blindheit, Endokrinopathien, Taubheit, Fanconi – Syndrom und Leberfunktionsstörungen hinzutraten. Die klinischen Details der 33 untersuchten Patienten sind in Tab. 6.3 auf S. 74 dargestellt.

Bei 6% (n=22) der Patienten kam es im Laufe ihres Lebens zur Rhabdomyolyse und/oder



Myoglobininurie. Auslösende Faktoren waren körperliche Anstrengung und fieberhafte Infekte. Nur in einem Fall fand sich eine Kardiomyopathie (Patient# 7). Bei diesem Patienten fand ich eine heteroplasmische Mutation im *Cytochrom b* – Gen (siehe S. 80).

| Patienten Nummer (Familie) | Alter bei Biopsie | Geschlecht | Myopathie                                      | Laktatazidose | mentale Retardierung | Enzephalopathie | Myoklonusepilepsie | Blindheit | Spastik | Endokrinopathie | Kardiomyopathie | Taubheit | weitere auffällige Befunde   |
|----------------------------|-------------------|------------|--|---------------|----------------------|-----------------|--------------------|-----------|---------|-----------------|-----------------|----------|--|
|                            |                   |            | Prozentsatz der Patienten mit o.g. Symptomatik |               |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          |  |
|                            |                   |            | 72%  | 54%           | 54%                  | 42%             | 30%                | 15%       | 15%     | 9%              | 3%              | 3%       |  |
| 1                          | 0,6               | M          | +  | +             |                      |                 |                    |           |         | +               |                 |          | kongenitale Hypothyreose mit ektopter Thyreoidea, Paraumbilikalhernie, bilaterale Inguinalhernien                  |
| 2                          | 0,4               | M          | +  |               |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          | Belastungsinsuffizienz   |
| 3                          | 3,5               | M          | +  | +             | +                    |                 |                    |           |         |                 |                 |          | vermehrte Schläfrigkeit  |
| 4                          | 0,3               | W          | +  | +             | +                    |                 |                    | +         |         |                 |                 |          | Leigh-Syndrom, Fanconi-Syndrom   |
| 5                          | 0,3               | M          | +  |               | +                    |                 |                    | +         |         |                 |                 |          | Fanconi-Syndrom  |
| 6                          | 1,7               | M          | +  | +             |                      | +               |                    |           | +       |                 |                 |          | Leigh-Syndrom  |
| 7 (E)                      | 21,5              | M          | +  | +             |                      | +               |                    |           |         | +               | +               |          | Kleinwuchs, hypertrophe Kardiomyopathie, septo-optische Dysplasie, Rhabdomyolyse                                   |
| 8                          | 55,2              | W          | +  |               | +                    | +               | +                  |           |         |                 |                 |          |  |
| 9                          | 55,5              | W          | +  |               | +                    | +               | +                  |           |         |                 |                 |          |  |
| 10                         | 0,1               | M          | +  |               | +                    | +               | +                  |           |         |                 |                 |          | pontozebelläre Hypoplasie, Corpus callosum-Hypoplasie, normale Myelinisierung                                      |
| 11                         | 2,2               | W          |  | +             |                      | +               |                    |           |         |                 |                 |          | Leukoenzephalopathie   |
| 12                         | 8,8               | M          | +  | +             |                      |                 |                    | +         | +       |                 |                 |          | Die Kindesmutter ist gesund aber die Schwester der Mutter und die Großmutter des Kindes haben eine Optikusatrophie |
| 13                         | 0,4               | W          |  | +             | +                    | +               | +                  |           |         |                 |                 |          |  |
| 14                         | 1,3               | M          |  |               | +                    | +               |                    |           |         |                 |                 |          | generalisierte Vaskulitis  |
| 15 (F)                     | 1,0               | M          |  |               | +                    | +               |                    |           |         | +               |                 |          | Diabetes mellitus Typ I, Leberversagen, Pachygyrie, Rhabdomyolyse bei Fieber                                       |
| 16                         | 2,2               | W          | +  | +             |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          | koninatale Muskelhypotonie (floppy infant)   |
| 17                         | 1,5               | W          | +  |               | +                    |                 | +                  |           |         |                 |                 |          | Riesenmitochondrien in der Elektronenmikroskopie   |
| 18                         | 0,2               | W          |  |               | +                    | +               |                    |           |         |                 |                 |          |  |
| 19                         | 1,6               | M          | +  | +             |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          | Belastungsinsuffizienz   |
| 20                         | 0,6               | M          |  |               |                      | +               | +                  |           |         |                 |                 |          |  |
| 21 (G)                     | 4,5               | W          | +  | +             | +                    |                 |                    |           |         |                 |                 |          | Makrozephalie, Hepatomegalie   |
| 22                         | 2,9               | W          |  | +             |                      | +               | +                  |           |         |                 |                 |          |  |
| 23                         | 3,0               | M          | +  | +             | +                    | +               |                    |           |         |                 |                 | +        | Leigh-Syndrom, Ataxie, Choreaethetose, Basalgangliendegeneration (Nucleus caudatus und Globus pallidus)            |
| 24                         | 6,3               | M          | +  |               |                      |                 |                    | +         |         |                 |                 |          | Kleinhirnhypoplasie  |
| 25                         | 7,0               | M          | +  |               |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          | Ptosis, Belastungsinsuffizienz   |
| 26 (H)                     | 3,3               | W          | +  | +             | +                    |                 | +                  |           | +       |                 |                 |          | Leigh-Syndrom, Ataxie, Choreaethetose  |
| 27                         | 5,2               | W          | +  | +             |                      |                 |                    |           | +       |                 |                 |          |  |
| 28                         | 47,8              | M          |  | +             | +                    |                 |                    | +         |         |                 |                 |          | Retinitis pigmentosa, Dystonie   |
| 29                         | 1,0               | M          | +  |               |                      | +               |                    |           |         |                 |                 |          |  |
| 30                         | 0,8               | W          | +  |               |                      |                 |                    |           |         |                 |                 |          |  |
| 31                         | 0,8               | M          | +  | +             | +                    |                 |                    |           |         |                 |                 |          |  |
| 32                         | 2,1               | W          | +  |               | +                    |                 | +                  |           | +       |                 |                 |          |  |
| 33                         | 0,4               | W          |  | +             | +                    |                 | +                  |           |         |                 |                 |          | Mikrozephalie  |

Tabelle 6.3: Klinische Symptome von Patienten mit einem Komplex III – Mangel. Bei drei Patienten (gelb unterlegt) wurden neue Mutationen im *Cytochrom b* – Gen gefunden. Ihre Kasuistiken sind im Abschnitt 4.1 detailliert beschrieben.

Aus den Beschreibungen der klinischen Bilder ergibt sich keine fest umschriebene Symptomenkonstellation, bei deren Vorliegen man mit großer Sicherheit von einem Komplex III-Mangel ausgehen könnte. Wie bei vielen anderen Mitochondriopathien auch, sind die durch verschiedene Mutationen im nukleären oder im mitochondrialen Genom verursachten Phänotypen weit überlappend. Da Störungen des Mitochondriums den gesamten Energiehaushalt der Zelle beeinträchtigen, beruhen die Symptome wahrscheinlich auf einer Dysfunktion jener Zellfunktionen, die am energieabhängigsten sind [169]. Diese Energieabhängigkeit variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Geweben und in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Embryos [115].

Eine klinische Klassifikation der Patienten mit Komplex III – Mangel erscheint derzeit wenig erfolgversprechend, da sie keinen Hinweis auf den Genotyp liefert. Als Beispiel hierfür sei eine Studie von Andreu *et al.* (1999) genannt. Sie stellten die *Belastungsinsuffizienz mit Muskelschwäche* jenseits des Kindesalters als zentrales Symptom der Patienten mit Komplex III – Mangel und Mutationen im mitochondrialen *Cytochrom b* – Gen heraus[10]. Dieses Symptom findet sich bei 73% der Patienten mit *Cytochrom b* – Mutationen (siehe auch Tab. 6.8, S. 95). Miro *et al.* (1999) untersuchten daraufhin die Muskelbiopsien derjenigen Patienten erneut, die mit dem Leitsymptom „Belastungsinsuffizienz“ den Arzt aufsuchten. In nur einem von 51 Patienten konnten sie einen Komplex III – Mangel finden [135]. Dieses Symptom erscheint zu unspezifisch, um eine umfangreiche Diagnostik mit Muskelbiopsie und biochemischen sowie molekulargenetischen Analysen zu rechtfertigen. Erst das Hinzutreten eines weiteren Symptoms, z.B. einer Myoglobulinurie/Rhabdomyolyse, einer Kardiomyopathie oder einer Hirnfehlbildung erhöht die Wahrscheinlichkeit, einen Komplex III – Mangel zu entdecken.

### 6.2.2 Komplex III – Mangel: der biochemische Phänotyp

Komplex III [Ubichinol:Cytochrom c – Oxidoreduktase] ist wie die anderen Atmungskettenkomplexe an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Der Komplex überträgt Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c und setzt die freie Energie in einen Protonenfluß aus der Matrix in den intermembranösen Raum des Mitochondriums um. Bei allen Patienten mit Verdacht auf einen Atmungskettendefekt werden in der Routinediagnostik die Komplexe I, II+III, III und IV gemessen.

Das Succinat:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex II+III) – Assay (S. 41) ist eine summarische Messung der Aktivitäten der Komplexe II und III und ihrer Kopplung. Die Kopplung geschieht durch Ubichinon als „Elektronenfähre“. Liegt ein Ubichinon

(Synonym: Coenzym Q<sub>10</sub>) – Mangel vor, sind die isolierten Aktivitäten der Einzelkomplexe II und III normal, nicht jedoch ihre Kopplung [64, 181, 19]. Die Kopplung im Komplex II+III Assay kann bei diesen Patienten durch exogen zugeführtes Ubichinon wiederhergestellt werden. Bei 15 der 33 Patienten fand sich eine erniedrigte Komplex II+III Aktivität, die sich auch nach Zugabe von exogenem Ubichinon nicht normalisierte. Dies bedeutet, daß die pathologisch erniedrigte Aktivität nicht auf einem Ubichinon – Mangel beruhte.

Bei allen Patienten fand sich bei Messung mit dem Decyl – Ubichinol – Assay (S. 42) ein Komplex III – Mangel mit Restenzymaktivitäten zwischen 26 und 94% der unteren Normgrenze (Abb. 6.12, Tab. 6.4). Mit diesem Assay wird die isolierte Komplex III – Aktivität gemessen, indem exogen zugeführtes Decyl – Ubichinol durch Komplex III zu Decyl – Ubichinon reduziert und Cytochrom c dabei oxidiert wird. Die Zunahme des oxidierten Cytochrom c kann spektrophotometrisch verfolgt werden. Das Assay ist unabhängig vom Ubichinon – Gehalt der Muskulatur. Eine Komplex III – Dysfunktion aufgrund mangelnder Substratkonzentration im Muskel könnte mit diesem Assay

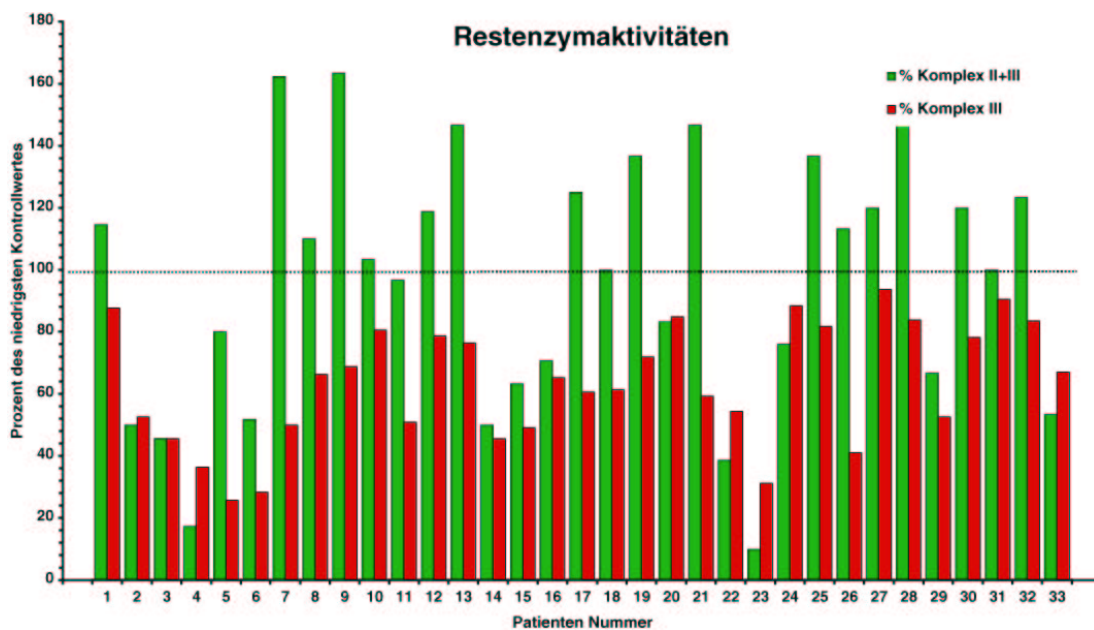


Abbildung 6.12: Aktivitäten der Komplexe II+III (grün) und des Komplexes III (rot) in Prozent der Restaktivität. Als 100% wurde die Untergrenze des jeweiligen Altersnormalwertes gesetzt (gestrichelte Linie). In n=18 Fällen (55% aller Patienten) war die summarische Aktivität der Komplexe II+III normal, obwohl ein Komplex III – Mangel vorlag. Bei dem Patienten #7 (Familie E, Kasuistik S. 34) wurde eine Mutation im *Cytochrom b* – Gen gefunden. Hier ist die Diskrepanz zwischen den Aktivitäten des Komplexes II+III und des Komplexes III besonders groß. Ähnliches gilt auch für die Patienten #21 (Familie G, Kasuistik S. 37) und #26 (Familie H, Kasuistik S. 37), die bisher unbekannte Sequenzvarianten im *Cytochrom b* – Gen aufwiesen.

nicht aufgedeckt werden, da ein künstliches Ubichinonderivat *in vitro* im Überschuß hinzugefügt wird [198].

In einigen Untersuchungen wurde zum Screening der Atmungskettenfunktion nur das summarische Komplex II+III – Assay eingesetzt [89, 197]. Aus einem normalen Meßwert wurde geschlossen, daß weder ein Komplex II noch ein Komplex III – Mangel vorliege. Wie aus Abb. 6.12 zu ersehen, ist dieser Schluß nicht gerechtfertigt. Hätten wir uns allein auf dieses Assay beschränkt, wäre ein Komplex III – Mangel bei 55%

| s                           | Alter [Jahre] bei Biopsie | Material     | C I                | C II+III           | C III              | C IV              | CII+III/CIII |
|-----------------------------|---------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| 1                           | 0,6                       | Muskel       | 0,180              | 0,34               | 2,50               | 1,76              | 0,14         |
| 2                           | 0,4                       | Muskel       | 0,310              | 0,15               | 1,50               | 0,81              | 0,10         |
| 3                           | 3,5                       | Muskel       | 0,114              | 0,14               | 1,30               | 1,02              | 0,11         |
| 4                           | 0,3                       | Muskel       | 0,070              | 0,05               | 1,04               | 1,73              | 0,05         |
| 5                           | 0,3                       | Muskel       | 0,117              | 0,24               | 0,73               | 1,20              | 0,33         |
| 6                           | 1,7                       | Fibroblasten | 0,150*             | 0,083*             | 0,36*              | 238**             | 0,23         |
| 7 (E)                       | 21,5                      | Muskel       | 0,090              | 0,49               | 1,43               | 0,98              | 0,34         |
| 8                           | 55,2                      | Muskel       | 0,13               | 0,33               | 1,89               | 1,77              | 0,17         |
| 9                           | 55,5                      | Muskel       | 0,094              | 0,49               | 1,96               | 1,22              | 0,25         |
| 10                          | 0,1                       | Muskel       | 0,088              | 0,31               | 2,30               | 1,19              | 0,13         |
| 11                          | 2,2                       | Muskel       | 0,089              | 0,29               | 1,45               | 1,01              | 0,20         |
| 12                          | 8,8                       | Fibroblasten | 0,170*             | 0,190*             | 1,00*              | 304**             | 0,19         |
| 13                          | 0,4                       | Muskel       | 0,137              | 0,44               | 2,18               | 2,33              | 0,20         |
| 14                          | 1,3                       | Muskel       | 0,070              | 0,15               | 1,30               | 1,15              | 0,12         |
| 15 (F)                      | 1,0                       | Muskel       | 0,075              | 0,19               | 1,40               | 0,84              | 0,14         |
| 16                          | 2,2                       | Muskel       | 0,085              | 0,21               | 1,86               | 0,82              | 0,11         |
| 17                          | 1,5                       | Fibroblasten | 0,130*             | 0,200*             | 0,77*              | 298**             | 0,25         |
| 18                          | 0,2                       | Muskel       | 0,080              | 0,30               | 1,75               | 0,96              | 0,17         |
| 19                          | 1,6                       | Muskel       | 0,103              | 0,41               | 2,05               | 1,55              | 0,20         |
| 20                          | 0,6                       | Muskel       | 0,074              | 0,25               | 2,42               | 0,92              | 0,10         |
| 21 (G)                      | 4,5                       | Muskel       | 0,082              | 0,44               | 1,69               | 1,30              | 0,26         |
| 22                          | 2,9                       | Muskel       | 0,130              | 0,12               | 1,55               | 0,89              | 0,07         |
| 23                          | 3,0                       | Muskel       | 0,093              | 0,03               | 0,89               | 1,04              | 0,03         |
| 24                          | 6,3                       | Muskel       | 0,072              | 0,23               | 2,52               | 1,28              | 0,09         |
| 25                          | 7,0                       | Muskel       | 0,082              | 0,41               | 2,33               | 1,01              | 0,17         |
| 26 (H)                      | 3,3                       | Muskel       | 0,007              | 0,34               | 1,71               | 1,13              | 0,20         |
| 27                          | 5,2                       | Muskel       | 0,084              | 0,36               | 2,67               | 1,11              | 0,13         |
| 28                          | 47,8                      | Muskel       | 0,090              | 0,49               | 2,39               | 1,80              | 0,21         |
| 29                          | 1,0                       | Muskel       | 0,090              | 0,20               | 1,50               | 0,92              | 0,13         |
| 30                          | 0,8                       | Muskel       | 0,070              | 0,36               | 2,23               | 1,27              | 0,16         |
| 31                          | 0,8                       | Muskel       | 0,097              | 0,30               | 2,58               | 1,55              | 0,12         |
| 32                          | 2,1                       | Muskel       | 0,081              | 0,37               | 2,38               | 1,61              | 0,16         |
| 33                          | 0,4                       | Muskel       | 0,100              | 0,16               | 1,91               | 1,18              | 0,08         |
| Normwerte                   |                           |              |                    |                    |                    |                   |              |
| für Muskel                  |                           |              | 0,07-0,25 (n=34)   | 0,3-0,97 (n=39)    | 2,85-6,61 (n=21)   | 0,81-3,12 (n=59)  |              |
| für gezüchtete Fibroblasten |                           |              | 0,11-0,26 * (n=14) | 0,16-0,44 * (n=14) | 1,27-2,62 * (n=14) | 147-252 ** (n=14) |              |

Tabelle 6.4: Biochemische Befunde von 33 Patienten mit Komplex III – Mangel. Patienten, bei denen neue Mutationen im *Cytochrom b* – Gen gefunden wurden, sind gelb unterlegt. Ihre Kasuistiken sind auf S. 34ff dargestellt. In der rechten Spalte sind die Quotienten zwischen Komplex II+III und isolierter Komplex III – Aktivität dargestellt. Auffällig sind die hohen Quotienten für die gelb unterlegten Patienten, insbesondere beim Patienten #7, bei dem eine heteroplasmische Mutation im *Cytochrom b* – Gen gefunden wurde. Die unterschiedlichen Normwerte für Muskelgewebe und Fibroblasten sind im Fuß der Tabelle angegeben. Einheiten: ohne Stern = mU/mU Citratsynthase; \* = mU/mU Cytochrom c Oxidase; \*\* = mU/mg Gesamtprotein

der Patienten nicht gefunden worden. Alle Patienten mit Mutationen im *Cytochrom b* – Gen (Patienten# 7, 21, 26) wiesen erniedrigte Komplex III, aber normale Komplex II+III – Werte auf. Es ist möglich, daß bei Komplex III – Mangel die Komplex II – Aktivität kompensatorisch hochreguliert wird, so daß bei dem „summarischen Assay“ normale Werte gemessen werden.

Der Versuch, die klinischen und biochemischen Befunde miteinander zu korrelieren, mißlang. Als diskriminierende Merkmale wurden [Komplex II+III – Aktivität > 100%] oder [Komplex II+III – Aktivität > Komplex III – Aktivität] verwendet. Keine der beiden biochemischen Merkmale korrelierte signifikant mit einem der in Tabelle 6.3 bezeichneten klinischen Symptome. Es ist bemerkenswert, daß die Diskrepanz zwischen den Aktivitäten, die im Komplex II+III und im Komplex III – Assay gemessen wurden, bei den Patienten mit Mutationen/ Polymorphismen im *Cytochrom b* – Gen besonders hoch waren. Dieser Sachverhalt wird nach Darstellung der genetischen Befunde auf S. 90 diskutiert.



### 6.2.3 Komplex III – Mangel: der Genotyp

Komplex III ist aus 11 Protein – Untereinheiten aufgebaut, von denen 10 nukleär kodiert sind. Nur eine Untereinheit, das Cytochrom b, ist durch die mitochondriale DNA kodiert [225]. Bisher wurden keine pathogenen Mutationen in den nukleär kodierten Untereinheiten des Komplexes III gefunden. Dagegen wurden einige Mutationen im mitochondrial kodierten *Cytochrom b* – Gen beschrieben [10, 41, 8, 53, 202, 100, 9].

| Patienten #     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | Positive Kontrollen |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------|
| 14766T>C (I>T)  |   |   |   |   |   | X | X |   |   |    |    |    | X  |    |    |    |    |    | X  | X  |    | X  | X  |    | X  | X  |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 14770C>T (N=N)  |   |   |   |   |   |   | X |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 14787T>C (L=L)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 14798T>C (F>L)  |   | X |   |   |   |   |   | X | X |    | X  |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    | X  |    |                     |
| 14831G>A (A>T)  |   | X |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    | 3/100               |
| 14849T>C (S>P)  |   |   |   |   |   |   | X |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0/100               |
| 14872C>T (I=I)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  | X  |    |    |    |    |    |    |                     |
| 14905G>A (M=M)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 14971T>C (Y=Y)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15074T>C (S>P)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0/100               |
| 15043G>A (G=G)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   | X  |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15148G>A (P=P)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15211C>T (T=T)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15218A>G (A>T)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 5/100               |
| 15257G>A (D>N)  | X |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 5/100               |
| 15301G>A (L=L)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15310T>C (I=I)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |                     |
| 15326 A>G (T>A) |   |   |   |   |   | X | X | X | X | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  |                     |
| 15440T>C (L=L)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15452C>A (L>I)  | X |   |   |   | X |   |   | X | X |    |    |    |    | X  | X  | X  |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15458T>C (S>P)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    | 0/100               |
| 15544C>T (P=P)  |   | X |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15607A>G (K=K)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15629T>C (L=L)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15693T>C (M>T)  |   | X |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15758A>G (I>V)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15775A>G (V=V)  |   |   |   | X |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15790C>T (T=T)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |
| 15812G>A (V>M)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 0/100               |
| 15886C>A (A=A)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |                     |
| 15904C>T (N=N)  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | X  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |                     |

Tabelle 6.5: Sequenzierungsdaten des *Cytochrom b* – Gens von 33 Patienten mit Komplex III – Mangel. In der linken Spalte sind die Basenabweichungen von der „Standard (Oxford) sequenz“, GenBank NC.001807 dargestellt. Die gelb und rot unterlegten Basenabweichungen werden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. **Gelbe** Basenabweichungen sind neutrale Polymorphismen, da sie nicht zum Aminosäureaustausch führen. Die **roten** Basenabweichungen führen zum Austausch einer Aminosäure. Drei der vier neuen Sequenzvarianten (14849T→C, 15074T→C, 15458T→C) konnten bei 100 Kontrollpersonen nicht nachgewiesen werden. Bei dem 14831G→A Basenaustausch handelt es sich um einen Polymorphismus, da er in 100 Kontrollen dreifach auftrat. Die beiden **blau** unterlegten Sequenzvarianten wurden in der Literatur im Zusammenhang mit der Leber'schen hereditären Optikusneuropathie diskutiert. Beim Patienten#15 (Familie F) treten beide gleichzeitig auf. Da sie auch bei den gesunden Geschwistern und der Mutter homoplasmisch nachweisbar sind, muß ihre Pathogenität in Frage gestellt werden.

Diese Berichte veranlaßten mich, in unserem Kollektiv von 33 Patienten mit Komplex III – Mangel nach Mutationen im *Cytochrom b* – Gen zu suchen. Das ganze Gen wurde dabei PCR – amplifiziert und mit verschachtelten Primern bidirektional sequenziert. Dabei fanden sich bei den 33 Patienten insgesamt 31 Abweichungen von der Standard (Oxford) – Sequenz (GenBank NC\_001807). 18 davon waren neutrale Sequenzvarianten ohne Aminosäureaustausch. In 13 Fällen kam es durch die Sequenzvariante zum Austausch einer Aminosäure. In sieben Fällen handelte es sich dabei um auch bei gesunden Probanden nachweisbare Sequenzvarianten (siehe MITOMAP), die sehr wahrscheinlich keine pathogene Wirkung besitzen.

In vier Fällen fand sich eine bisher nicht beschriebene Sequenzvariante (14831G→A, 14849T→C, 15074T→C, 15458T→C) und in zwei Fällen eine Sequenzvariante mit bisher ungeklärter Pathogenität (15257G→A, 15812G→A).

Um festzustellen, ob es sich bei den o.g. Sequenzvarianten um pathogene Mutationen

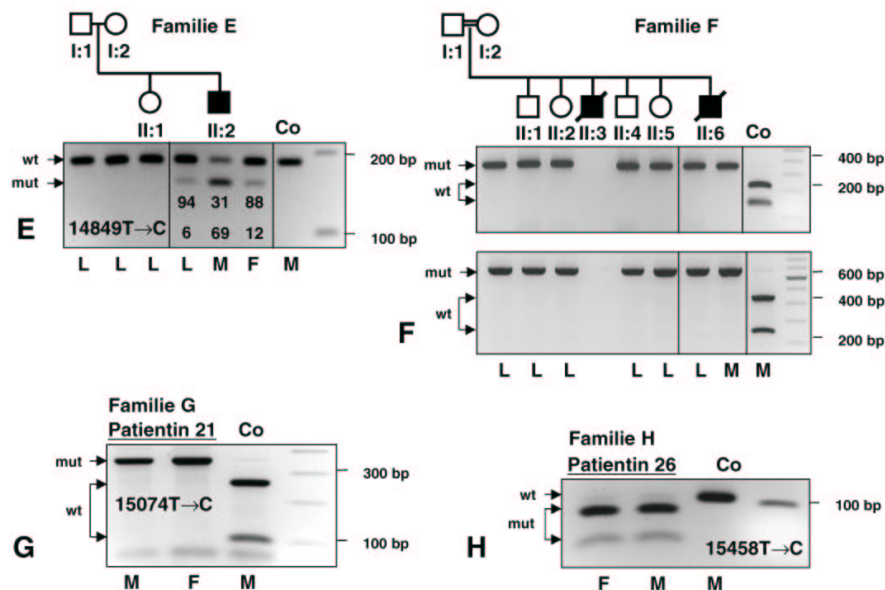


Abbildung 6.13: (E) Stammbaum der Familie E (Patient# 7). Nachweis der 14849T→C – Mutation: das Restriktionsenzym *Hae* III schneidet die mutierte DNA. (F) Stammbaum der Familie F (Patient# 15), Nachweis der 15812G→A – Sequenzvariante: das Restriktionsenzym *Rsa* I schneidet nur die Wildtyp – DNA. Nachweis der 15257G→A Sequenzvariante: das Restriktionsenzym *Ace* I schneidet nur die Wildtyp – DNA (G) Familie G (Patientin# 21). Nachweis der 15074T→C – Sequenzvariante: das Restriktionsenzym *Dde* I schneidet nur die Wildtyp – DNA. (H) Familie H (Patientin# 26): Nachweis der 15458T→C – Sequenzvariante: das Restriktionsenzym *Nci* I schneidet nur die mutierte DNA. Auf der rechten Seite ist jeweils eine 100 bp Referenzleiter aufgetragen. wt = Wildtyp, mut = Mutante, Co = Kontrollperson, L = DNA aus Lymphozyten, M = DNA aus Muskel, F = DNA aus Fibroblasten

| Sequenzvariante                          | 14849T→C<br>Familie E | 15074T→C<br>Familie G | 15458T→C<br>Familie H | 15257G→A<br>Familie F | 15812G→A<br>Familie F |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Fehlender Nachweis bei Normalkontrollen  | +                     | +                     | +                     | -                     | +                     |
| Austausch einer konservierten Aminosäure | +                     | -                     | -                     | +                     | -                     |
| Heteroplasmie                            | +                     | ?                     | ?                     | -                     | -                     |
| Genotyp – Phänotyp Relation              | +                     | ?                     | ?                     | -                     | -                     |
|  | Mutation              | ungeklärt             | ungeklärt             | Polymorphismus        | Polymorphismus        |

Tabelle 6.6: Überprüfung der Pathogenitätskriterien nach DiMauro *et al.* (2000) (50). Nur die 14849T→C Mutation erfüllt alle Kriterien. Bei den 15257G→A und 15812G→A Sequenzvarianten handelt es sich um Polymorphismen. Für die 15074T→C und 15458T→C Sequenzvarianten konnte die Pathogenität nicht sicher geklärt werden, da keine DNA gesunder Familienangehöriger zur Verfügung stand.

handelt, habe ich zunächst jeweils 100 gesunde Normalkontrollen auf das Vorhandensein der jeweiligen Sequenzvariante geprüft. Für jede dieser Untersuchungen wurde ein Restriktions-Längen – Polymorphismus (RFLP) – Assay etabliert. Die in Abhängigkeit von der Sequenzvariante generierten Banden sind in Abb. 6.13 dargestellt. Die Varianten 14849T→C, 15074T→C, 15458T→C und 15812G→A fanden sich nicht bei Normalkontrollen. Die 15257G→A war bei fünf und die 14831G→A bei drei Normalkontrollen vorhanden, so daß deren Pathogenität unwahrscheinlich ist. Die derzeit anerkannten Pathogenitätskriterien für Mutationen in der mitochondrialen DNA nach DiMauro *et al.* (2000) lauten:[50]

1. Die Mutation darf nicht bei gesunden Kontrollpersonen (n=100) gefunden werden.
2. Der Basenaustausch muß zur Änderung einer in der Evolution konservierten oder funktionell wichtigen Aminosäure führen.
3. Die Mutation sollte heteroplasmisch in unterschiedlichen Geweben bzw. bei verschiedenen Familienmitgliedern sein. <sup>†</sup>
4. Der Grad der Heteroplasmie sollte mit der Schwere des Phänotyps korrelieren.

Die neu gefundenen Sequenzvarianten werden nun diskutiert (siehe auch Tab. 6.6):

**14849T→C (Ser35Pro):** Diese Sequenzvariante des Indexpatienten der Familie E (Kasuistik S. 34) wurde weder bei seinen Eltern noch bei seiner älteren Schwester

<sup>†</sup>Diese „Forderung“ kann allerdings selbst für sicher pathogene Mutationen (unter anderem die erste je publizierte mtDNA Mutation [212]) nicht in vollem Maße aufrecht erhalten werden.



gefunden (Abb. 6.13E, S. 80). Der Heteroplasmiegrad der mutierten mitochondrialen DNA variierte beim Indexpatienten zwischen 6% (periphere Blutzellen), 12% (Fibroblasten) und 69% (Muskel). Der hohe Heteroplasmiegrad im Muskel geht mit dem Leitsymptom einer Muskel – Belastungsinsuffizienz und Kardiomyopathie einher (Genotyp – Phänotyp – Relation). Die Mutation führt zu einem Austausch eines Serins durch ein Prolin. Das Serin an Position 35 ist evolutionär von der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bis zum Menschen konserviert. Der Austausch dieser Aminosäure hat auf die dreidimensionale Struktur des Cytochrom b folgende hypothetische Auswirkungen:

1. Das Serin an Position 35 stellt die Hydroxylgruppe zur Verfügung, mit der Cytochrom b das Ubichinon an der  $Q_i$  – Bindungsstelle über eine Wasserstoffbrücke bindet (Abb. 6.15, S. 85). Es ist zu vermuten, daß Ubichinon im mutierten Cytochrom b nicht oder nicht ausreichend stark bindet, so daß der Elektronentransfer behindert wird.
2. Das Serin an Position 35 befindet sich inmitten einer  $\alpha$  – Helix. Aufgrund seiner sterischen Besonderheiten (Winkelbildung, keine freie Drehbarkeit der N=C – Bindung [22]) stört das Prolin die Ausbildung der  $\alpha$  – Helix empfindlich, so daß dies einen Einfluß sowohl auf das Bindungsverhalten des Ubichinons als auch auf das der benachbarten Häm  $b_H$  – Gruppe (Abb. 6.15, S. 85) haben kann. Andreu *et al.* (1999) [10] beschrieben einen Patienten, der eine Gly34Ser Mutation in der benachbarten Aminosäure aufwies und ebenfalls an einer Belastungsinsuffizienz und Muskelschwäche litt, jedoch mit einem mildereren klinischen Verlauf als bei unserem Patienten. Über MRT – Befunde dieses Patienten ist nichts bekannt.

Interessanterweise sind die bisher als sicher pathogen eingestuften *Cytochrom b* – Mutationen immer spontan aufgetreten und wurden nicht über die mütterlichen Linie vererbt. Dies gilt auch für diesen Indexpatienten. Da sich die 14849T→C Mutation aber sowohl in ektodermalem (Fibroblasten) als auch in mesodermalem Gewebe (Leukozyten, Muskel) nachweisen ließ, muß die Mutation in der frühen Embryogenese oder sogar bereits während der Oogenese spontan aufgetreten sein.

**15074T→C (Ser110Pro):** Diese Sequenzvariante wurde bei der Indexpatientin der Familie G (Kasuistik S. 37) gefunden. Da das Kind aus Kolumbien adoptiert wurde, konnte die mitochondriale DNA von Verwandten nicht untersucht wer-

den. Die Sequenzvariante ließ sich sowohl in den Fibroblasten als auch im Muskel der Patientin in homoplasmischer Form nachweisen. Sie war in 100 Normalkontrollen nicht auffindbar. Phylogenetisch ist die Aminosäure an der Position 110 nicht konserviert (Abb. 6.14, S. 84), aber auch sie liegt im Bereich einer  $\alpha$  – Helix, die sehr wahrscheinlich durch ein Prolin gestört wird. Die Pathogenität dieser Sequenzvariante ist daher leider nicht sicher zu beweisen.

**15458T→C (Ser238Pro):** Diese Sequenzvariante wurde bei der Indexpatientin der Familie H (Kasuistik S. 37) gefunden. Da die Eltern nicht bereit waren, ihre eigene DNA oder die DNA des betroffenen Bruders untersuchen zu lassen, konnten keine Daten zur Segregation der Sequenzvariante mit dem klinischen Phänotyp gewonnen werden. Die Sequenzvariante wurde sowohl in den Fibroblasten als auch im Muskel der Patientin in homoplasmischer Form gefunden. Sie war in 100 Normalkontrollen nicht nachweisbar. Phylogenetisch ist die Aminosäure an der Position 238 nicht konserviert (Abb. 6.14, S. 84). Sie liegt aber innerhalb einer  $\alpha$  – Helix, die sehr wahrscheinlich durch einen Austausch zu Prolin gestört wird. Da die betroffene  $\alpha$  – Helix<sub>E</sub> das Cytochrom b in der inneren Mitochondrienmembran verankert, kann man vermuten, daß dieser Aminosäureaustausch den Gesamtkomplex destabilisiert.

Einen besonderen Fall stellt die Familie F dar (Kasuistik S. 35). Beim Indexpatienten lagen zwei Sequenzvarianten vor, die in der Literatur gelegentlich im Zusammenhang mit einer Leber'schen Optikusatrophie diskutiert wurden [82, 26, 93]. Dies sind die 15257G→A und die 15812G→A Sequenzvarianten. Im folgenden Abschnitt werden diese beiden Sequenzvarianten gesondert diskutiert.

**15257G→A (Asp171Asn)** Diese Sequenzvariante fand ich bei drei der 33 Patienten mit Komplex III – Mangel (Patienten #1, 15 und 24, Tab. 6.5, S. 79). Bei allen Patienten war sie homoplasmisch. Durch diese Sequenzvariante wird eine phylogenetisch konservierte Asparaginsäure in ein basisches Arginin vertauscht. Initial wurde diese Sequenzvariante gehäuft bei Patienten mit Leber'scher hereditärer Optikusatrophie (LHON) beschrieben [93, 26]. Später wurde die Pathogenität dieser Sequenzvariante in Frage gestellt, da sie in der Mehrzahl der Fälle gleichzeitig mit sogenannten „primären“ LHON – Mutationen (nt3460, nt14484 und nt11778) gefunden wurde [145, 129]. Bei fünf LHON – Patienten fand man diese Mutation jedoch ohne Vergesellschaftung mit einer „primären“ – LHON – Mutation [82], so daß die Pathogenitätsdiskussion weiter offen blieb.

Keiner unserer Patienten mit der 15257G→A Sequenzvariante oder deren Blutsverwandte wiesen eine Optikusneuropathie auf. Beim Screening von 100 Individuen fand sich diese Sequenzvariante in 5% der gesunden Normalkontrollen und nur in homoplasmischer Form, so daß diese sie als alleinige Ursache der Leber'schen hereditären Optikusneuropathie in Frage gestellt werden muß. Sowohl die gesunden als auch die erkrankten Angehörigen der Familie F wiesen die 15257G→A Sequenzvariante in homoplasmischer Form auf, so daß damit eine Pathogenität ausgeschlossen ist oder an weitere z.B. nukleär vererbte Gene gebunden ist. Bei der Leber'schen hereditären Optikusneuropathie wird ein deutliches Überwiegen des männlichen Geschlechts beobachtet [129]. Da auch unsere Patienten mit der 15257 G→A Sequenzvariante männlich sind, kann man vermuten, daß dieses weitere Gen auf dem X – Chromosom liegen kann.

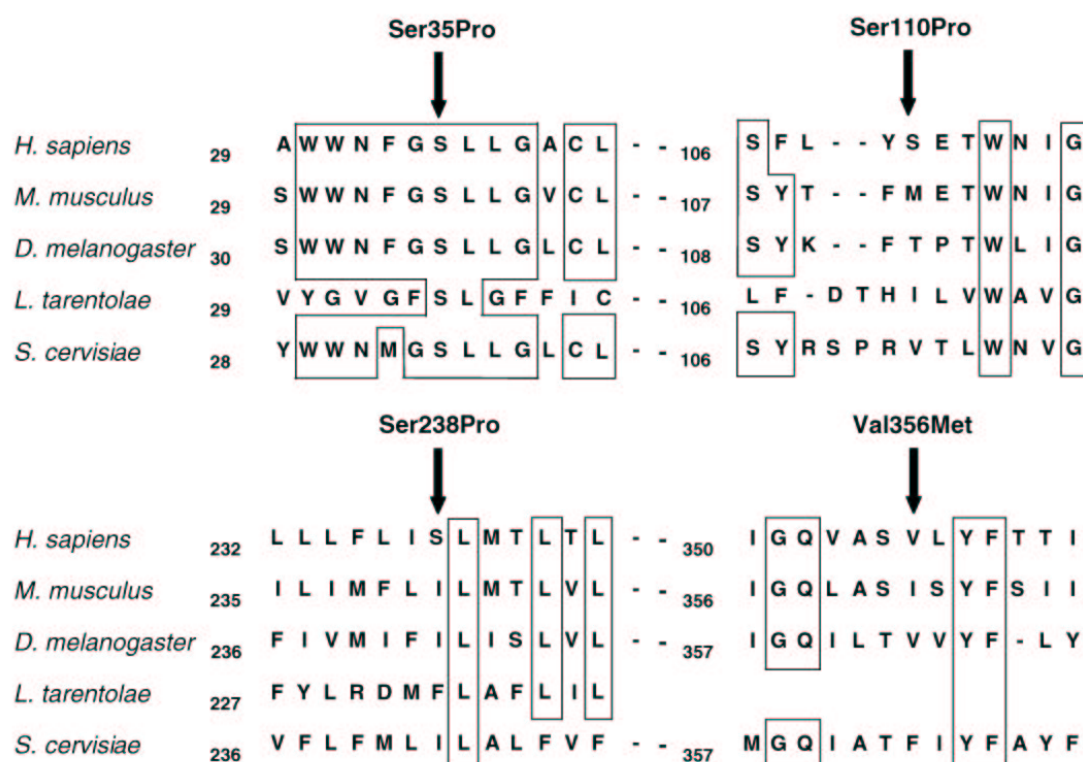


Abbildung 6.14: Alignment der Cytochrom b – Polypeptidsequenzen unterschiedlicher Spezies. Die in dieser Arbeit diskutierten Sequenzvarianten sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Einzig die Ser35-Position ist bei allen dargestellten Spezies hochkonserviert. Die GenBank – Zugriffsnummern der Sequenzen sind (von oben nach unten): NC\_001807, NC\_001569, NC\_001709, L07542, NC\_001224

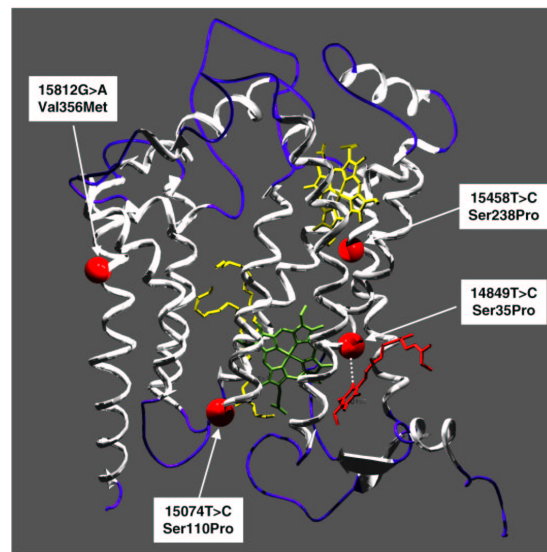


Abbildung 6.15: Die dreidimensionale röntgendiffraktometrisch untersuchte Struktur des Cytochrom b des Huhns. (Zugangscode der PDB – Database: 1BCC.pdb) Die Positionen der in dieser Arbeit diskutierten Sequenzvarianten sind durch rote Kugeln dargestellt. Die roten Kugeln entsprechen dem Sauerstoff-Atom der veresterten Carboxylgruppe der jeweiligen Aminosäure. Die Ser35Pro – Mutation führt zu einer Störung der Wasserstoffbrückenbindung (weiß gepunktete Linie) zwischen der Hydroxylgruppe des Serins und der Keto-Gruppe des Ubichinons und möglicherweise auch zu einer gestörten Bindung der Häm  $b_H$  – Gruppe. Die Ser110Pro – und Ser238Pro – Sequenzvarianten liegen beide im Bereich einer  $\alpha$  – Helix, welche durch den Einbau eines Prolins durch sterische Restriktionen „verbogen“ oder sogar unterbrochen wird.

**15812G→A (Val356Met)** Diese Sequenzvariante fand sich in unserem Patientenkollektiv nur einmal (Abb. 6.15, S. 85). Sie trat sowohl beim Indexpatienten als auch bei allen gesunden Familienmitgliedern in homoplasmischer Form auf (Familie F, Kasuistik S. 35). Beim Screening von 100 Normalkontrollen fand sich diese Sequenzvariante nicht. Sie verursacht den Austausch eines Valins gegen ein Methionin. Das Valin an Position 356 ist phylogenetisch nicht konserviert, aber es finden sich bei unterschiedlichen Spezies an dieser Position nur neutrale Aminosäuren (Abb. 6.14, S. 84), so daß eine basische Aminosäure an dieser Position zu einer Funktionseinschränkung des Cytochrom b führen kann.

Die 15812G→A Mutation wurde erstmals beim Screening eines Patientenkollektives mit Leber'scher hereditärer Optikusneuropathie entdeckt und trat immer zusammen mit dem 15257G→A Polymorphismus auf [93]. Der Nachweis des 15812G→A Polymorphismus sowohl beim erkrankten Indexpatienten als auch bei den gesunden Familienmitgliedern läßt die Pathogenität der 15812G→A Sequenzvariante fraglich erscheinen.

|               | $\alpha$ -Tocopherol | $\gamma$ -Tocopherol | Coenzym Q10       | TRAP              |
|---------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Muskel</i> |                      |                      |                   |                   |
| Patient #7    | <b>21,6 *</b>        | <b>1,5 *</b>         | 25,4 *            |                   |
| Normwerte     | 28,6-61,6 * (n=5)    | 2,8-10,2 * (n=5)     | 25,0-58,5 * (n=5) |                   |
| <i>Plasma</i> |                      |                      |                   |                   |
| Patient #7    | 21,2 **              | 3,1 **               | 0,98 **           | 737 **            |
| Normwerte     | 19,4±5,2 ** (n=72)   | <3 ** (n=72)         | 0,2-1,5 ** (n=17) | 800±203 ** (n=17) |

\* nmol/g FG, \*\*  $\mu$ mol/L

Tabelle 6.7: Bestimmung der lipophilen Antioxidantien im Plasma und im Muskelgewebe des Patienten #7 (Familie E). Es findet sich eine im Vergleich zu den Normalkontrollen erniedrigte  $\alpha$  – und  $\gamma$  – Tocopherol-konzentration in der Muskulatur des Patienten. Dies kann ein Hinweis auf einen erhöhten  $\alpha$  – Tocopherol-verbrauch bei gesteigerter Radikalbelastung sein. Die im Plasma gemessenen Werte liegen alle im Normbereich. Die Ubichinon – Konzentration im Plasma und im Muskel ist ebenfalls normal. TRAP = total radical trapping antioxidant parameter of the plasma, FG = Frischgewicht

#### 6.2.4 Besteht eine Genotyp – Phänotyp Relation?

Da es bei nur einem von 33 Patienten gelang, eine sicher pathogene Mutation im *Cytochrom b* – Gen nachzuweisen, handelt es sich somit bei den untersuchten Probanden um eine genetisch sehr heterogene Population. Da bei der Mehrzahl der Patienten dieser Studie der genetische Defekt unentdeckt blieb und eher in einem der 10 nukleär kodierten Gene des Komplexes III oder in einem Assembly – Gen zu vermuten ist, beschränke ich die folgende Genotyp – Phänotyp – Diskussion auf Patienten mit Mutationen im mitochondrialen *Cytochrom b* – Gen.

Selbst diese Patienten unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrem Phänotyp. Eine Zusammenfassung der bisher in der Literatur beschriebenen klinische Phänotypen und *Cytochrom b* – Mutationen einschließlich meiner eigenen Arbeit gibt Tabelle 6.8. Belastungsinsuffizienz und Laktatazidose scheinen nahezu konstante Merkmale zu sein. Bei einem Drittel der Patienten sind dies die einzigen Symptome. Bei zwei Dritteln treten weitere Symptome hinzu. Dies sind eine Myoglobinurie in 20%, ein WPW – Syndrom in 20%, eine Kardiomyopathie in 26%, eine Epilepsie in 20% und eine Bewegungsstörung in 20% der Fälle.

Die Verschiedenheit des Phänotyps bei unterschiedlichen Mutationen des gleichen Gens beruht wahrscheinlich einerseits auf der jeweils spezifischen Beeinträchtigung von Struktur und Funktion der Polypeptidkette und der daraus resultierenden Funkti-

onseinbuße des Gesamtkomplexes. In Abhängigkeit von der Pathogenität der Mutation wird der Heteroplasmiegrad in der einzelnen Zelle ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Nicht zuletzt ist die Gewebsheteroplasmie ein weiterer für die Symptomenkonstellation bedeutsamer, aber in den bisherigen Publikationen nicht hinreichend untersuchter Faktor. Die in Tabelle 6.8 angegebenen Heteroplasmiegrade wurden nur in der Muskulatur bestimmt.

Um festzustellen, wie sich die gleiche Mutation in unterschiedlichen Heteroplasmiegraden auf den Phänotyp auswirkt, müßte man betroffene Geschwister vergleichen. Keiner der beschriebenen Patienten hat jedoch betroffene Geschwister, da es sich bei den *Cytochrom b* – Mutationen um spontane, somatische Mutationen handelt. Über die Nachkommenschaft von Patienten mit *Cytochrom b* – Mutationen ist nichts publiziert, so daß man nicht weiß, ob somatisch entstandene *Cytochrom b* – Mutationen in der Keimbahn weitergegeben werden können. Sichere Aussagen zur Genotyp – Phänotyp Relation sind somit nicht möglich.

*Aus den oben genannten Befunden ergibt sich aber die Empfehlung, bei Patienten mit Belastungsinsuffizienz und einem weiteren Symptom nach einem isolierten Komplex III – Mangel und nach Mutationen im Cytochrom b – Gen zu suchen. Ein positiver Mutationsnachweis hat therapeutische Konsequenzen, da Patienten mit Komplex III – Mangel positiv auf eine Therapie mit hohen Dosen Ascorbinsäure und Menadion ansprechen [100, 139]. Man vermutet, daß diese beiden Substanzen die durch den defekten Komplex III verursachte Elektronentransport – Blockade „überbrücken“ oder als Antioxidans wirken [12].*

## 6.2.5 Hypothesen zur Pathogenese der *Cytochrom b* – Mutationen

### Schädigung durch ATP – Mangel

Eine offensichtliche Erklärung für die Dysfunktion der Zelle mit einem Atmungskettendefekt ist der ATP – Mangel aufgrund der verminderten oxidativen Phosphorylierung. Hier existieren zahlreiche Arbeiten mit sogenannten Rho<sup>0</sup> – Zellen. Dies sind Zellen, die in mit Ethidiumbromid versetztem Medium gezüchtet werden. Ethidiumbromid verhindert in Konzentrationen zwischen 0,1 – 1 µg/ml selektiv die Duplikation der mitochondrialen DNA. Die Zellen verlieren nach mehreren Teilungsphasen ihre Mitochondrien und sind nur noch auf mit Uridin und Pyruvat supplementierten Medien wachstumsfähig. [107] Rho<sup>0</sup> – Zellen können mit entkernten Spenderzellen oder mit kernlosen Spenderthrombozyten eines Patienten zu transmitochondrialen Zellini-



en, sogenannten „Cybriden“ fusioniert werden. [108] Diese Cybride besitzen einen uniformen genetischen Hintergrund und dem Zufall folgend wechselnde Heteroplasmiegrade. Danach versetzt man die Cybride wiederum für kurze Zeit mit Ethidiumbromid, bis sich die Mitochondrienpopulation auf einige wenige Mitochondrien vermindert hat. Nach Entfernen des Ethidiumbromids vermehren sich die „überlebenden“ Mitochondrien wieder. Diese sogenannte „Flaschenhals“ (bottleneck) – Züchtung führt zur Verschiebung des Heteroplasmiegrades einzelner Zellen, in Extremfällen sogar zur Homoplasmie für die mutierte mitochondriale DNA. [106] Mit dieser Methode ist es möglich, Zelllinien mit unterschiedlichen Heteroplasmiegraden experimentell zu generieren und biochemisch zu untersuchen.

Dabei fand man, daß bei Zellen mit der 3243A→G (MELAS) – Mutation ein biochemischer Defekt der oxidativen Phosphorylierung erst ab einem Heteroplasmiegrad von über 85% nachweisbar ist [167, 81]. Rana *et al.* (2000) führten ein ähnliches Experiment mit einer Mutation im mitochondrialen *Cytochrom b* – Gen durch und fanden eine um ca. 30% erniedrigte Rate der oxidativen Phosphorylierung bei einem Heteroplasmiegrad von 70% (4 bp Deletion, Tab. 6.8, S. 95) [156]. Aufgrund der natürlichen Reserven der Zelle scheint sich ein Defekt der oxidativen Phosphorylierung erst ab einem Heteroplasmiegrad von etwa 70 – 80% auszuwirken. Tatsächlich korreliert der klinische Phänotyp einiger schwer betroffener Patienten aus der Literatur mit einem hohen Heteroplasmiegrad. Wie aus Tabelle 6.8 ersichtlich, hatten beide Kinder, die im Alter von 4 Monaten und 9 Jahren an einer Kardiomyopathie verstarben, einen Heteroplasmiegrad von 90% für die jeweiligen Mutationen. Diese Erklärung genügt jedoch nicht, um Symptome zu erklären, die bei Patienten mit niedrigem Heteroplasmiegrad auftreten, z.B. Parkinsonoid, Rhabdomyolyse und WPW – Syndrom. Hier muß ein anderer Pathomechanismus ursächlich beteiligt sein.

### **Zellschädigung durch Sauerstoffradikale**

Ungefähr 85 – 90% des von eukariontischen Zellen aufgenommenen Sauerstoffs wird von den Mitochondrien zur aeroben ATP – Synthese verbraucht. [77] Ungefähr 1 – 2% dieses Sauerstoffs wird nicht zur oxidativen Phosphorylierung benutzt, sondern in  $H_2O_2$  umgewandelt. Entstehungsort des  $H_2O_2$  in der Zelle ist der Komplex III, da die  $H_2O_2$  – Produktion durch gezielte Hemmung des Komplexes III mit Antimycin A deutlich gesteigert werden kann. [224] Eine Hemmung des Komplexes I durch Rotenon oder des Komplexes IV durch Cyanid hat keinen vergleichbaren Effekt [76, 127]. Der *hypothetische* Wirkmechanismus der Sauerstoffradikal – Produktion nach Anti-

mycin A – Applikation ist in Abb. 6.16 dargestellt. Ubichinon konkurriert mit Antimycin A um die Bindungsstelle, Antimycin A hat aber die höhere Affinität [49]. Nach Bindung von Antimycin A an die  $Q_i$  – Bindungsstelle können die von der  $Q_0$  – Bindungsstelle zugeführten Elektronen nicht mehr auf Ubichinon übertragen werden. Statt dessen werden Sauerstoffmoleküle zu  $O_2^{\bullet-}$  – Radikalen reduziert. Der Elektronentransport über Komplex III zum Cytochrom c funktioniert noch weiter. Außerdem ist der Protonentransport durch die innere Mitochondrienmembran weniger effizient, da auf der Matrixseite der Membran keine Protonen mehr zur Ubichinon – Reduktion benötigt werden. Hemmt man den Elektronenfluß von der  $Q_0$  – zur  $Q_i$  – Bindungsstelle, sistiert die  $O_2^{\bullet-}$  – Radikalproduktion. Dies kann (A) durch Hemmung der Komplex I – vermittelten Ubichinon – Reduktion geschehen (Hemmung durch Rotenon). In diesem Falle existieren weniger Ubichinol – Moleküle, die an der  $Q_0$  – Stelle binden können. (B) Den gleichen Effekt kann man durch Blockierung der  $Q_0$  – Bindungs-

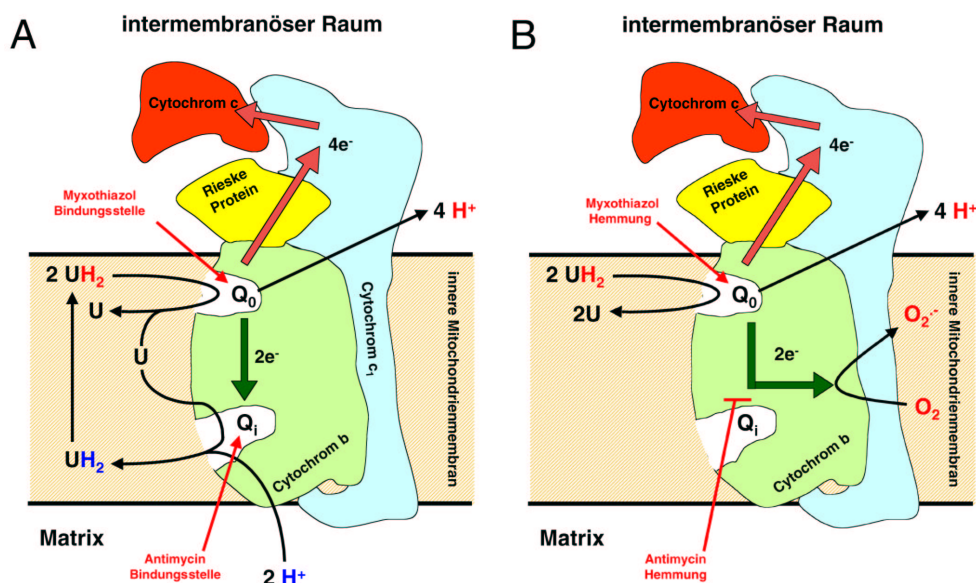


Abbildung 6.16: (A) Intakter Q – Zyklus. Der grüne Pfeil stellt den physiologischen Elektronentransport von der  $Q_0$  – über zwei Häm – Gruppen zur  $Q_i$  – Bindungsstelle dar. An der  $Q_i$  – Bindungsstelle wird Ubichinon reduziert und nimmt zwei Protonen aus der Mitochondrienmatrix auf. Zur Beschreibung des Q – Zyklus siehe auch Abb. 2.7, S. 15. (B) Ist die  $Q_i$  – Bindungsstelle durch Antimycin A blockiert, können die Elektronen von der  $Q_0$  – Bindungsstelle nicht mehr auf Ubichinon übertragen werden. Statt dessen werden sie auf molekularen Sauerstoff übertragen, der zu  $O_2^{\bullet-}$  – Radikalen reduziert wird. Da die  $Q_0$  – Bindungsstelle noch intakt ist, funktioniert der Elektronenfluß nach Cytochrom c weiter, so daß die Atmungskette nicht vollständig unterbrochen ist. In diesem Falle funktioniert die Atmungskette nur „auf Kosten“ einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen. Nach Blockierung der  $Q_0$  – Bindungsstelle durch Myxothiazol oder nach Blockierung der Ubichinol – Zufuhr durch Hemmung des Komplexes I (mittels Rotenon) sistiert die Sauerstoffradikal – Produktion. Damit ist gezeigt, daß die Produktion von Sauerstoffradikalen ein zumindest teilweises Funktionieren des Elektronenflusses durch Komplex III voraussetzt.



stelle mittels Myxothiazol erreichen. In beiden Fällen nimmt die Sauerstoffradikal – Produktion ab. Dies bedeutet, daß für die Entstehung schädlicher Sauerstoffradikale zumindest eine Teilfunktion des Komplexes III, insbesondere der Elektronenfluß von Ubichinol zu Cytochrom c, erhalten bleiben muß.

Die 14849T→C – Mutation (Ser35Pro) des Patienten #7 (Familie E) verändert die  $Q_i$  – Bindungsstelle derart, daß dort weder Antimycin A noch Ubichinol binden können. Einen Hinweis auf den hier wirksamen Pathomechanismus bietet eine Mutation im *Apocytochrom b* – Gen bei *Leishmania tarentolae*. Die Ser35Ile – Mutation (siehe Abb. 6.14, S. 84) betrifft dort die gleiche konservierte Aminosäure (Serin). Dies führt bei den Leishmanien zu einer Antimycin A – Resistenz. Leishmanien mit dieser Mutation können sich noch in Gegenwart der 20 fachen Antimycin A – Konzentration vermehren, die für Leishmanien ohne Mutation zu 50% letal ist ( $LD_{50}$ ).

Eine Antimycin A Resistenz des Patienten bietet eine gute Erklärung für die hohe Diskrepanz zwischen den Meßwerten für die Komplex II+III – Aktivität versus der isoliert gemessenen Komplex III – Aktivität (Abb. 6.12, S. 76). Da die  $Q_0$  – Bindungsstelle erhalten ist, kann der Elektronenfluß von Ubichinol auf Cytochrom c ungehindert stattfinden. Daher mißt man im Komplex II+III – Assay normale Werte. Im isolierten Komplex III – Assay wird die Reaktion mit Antimycin A gehemmt, um die Spezifität des Assays zu testen. Die nach Hemmung noch nachweisbare Aktivität wird als unspezifisch gedeutet und von der Gesamtaktivität abgezogen. Da man annehmen kann, daß sich bei diesem Patienten die Komplex III – Aktivität nicht oder nur schlecht durch Antimycin A hemmen läßt, führt dies zu einer Überschätzung der unspezifischen Aktivität, so daß nach Subtraktion nur noch wenig „spezifische“ Aktivität übrigbleibt.

Die Ser35Pro – Mutation des Patienten #7 (Familie E) müßte zellphysiologisch die gleiche Auswirkung haben, als sei die  $Q_i$  – Bindungsstelle durch Antimycin A blockiert. Die von der  $Q_0$  – Bindungsstelle kommenden Elektronen können nicht mehr auf Ubichinon übertragen werden. Dies führt zu der oben beschriebenen Zunahme der freien Radikale. Rana *et al.* (2000) haben diesen Sachverhalt für die 4 bp Deletion des humanen *Cytochrom b* – Gens nachgewiesen (Tab. 6.8, S. 95)[156]. Die 4 bp Deletion führte bei einer Heteroplasmie von 64% nur zu einer 30%igen Verminderung der oxidativen Phosphorylierung und bei Homoplasmie zum Erliegen der ATP – Produktion. Die  $H_2O_2$  – Produktion erreichte jedoch bei 64% Heteroplasmie bereits so hohe Werte, wie sie auch bei 70% Heteroplasmie und Homoplasmie gemessen wurden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß die Generierung von Sauerstoffradikalen ein wichtiger pathogener Faktor ist. Inwieweit der Ort der Mutation in der Cytochrom b – Poly-

peptidkette die Höhe der Radikalanflutung beeinflusst, ist nicht bekannt, da Rana *et al.* (2000) ihr Experiment nur für die 4 bp Deletion durchführten. Um eine Vorstellung vom Antioxidantienstatus des Patienten #7 (Familie E) zu gewinnen, bestimmten wir die lipophilen Antioxidantien im Muskel und im Serum des Patienten. Die Konzentrationen für Ubichinon,  $\alpha$  – und  $\gamma$  – Tocopherol im Plasma und die Ubichinon – Konzentration im Muskelgewebe waren normal (Tab. 6.7). Die erniedrigten  $\alpha$  – und  $\gamma$  – Tocopherolkonzentrationen im Muskelgewebe des Patienten legen aber den Schluß nahe, daß dort vermehrt  $\alpha$  – Tocopherol zur Radikalvernichtung verbraucht wird.

Der hier diskutierten Pathomechanismus kann auch mit anderen, bei Patienten mit *Cytochrom b* – Mutationen beobachteten Symptomen in Verbindung gebracht werden. Dies sind Myoglobinurie/ Rhabdomyolyse, WPW – Syndrom und Parkinsonoid.

### **Rhabdomyolyse**

Während sportlicher Betätigung, bei starker muskulärer Belastung oder bei erhöhtem Grundumsatz wird der Sauerstoffverbrauch der Körpers um das 10 bis 15 fache des Ruheverbrauches gesteigert. Die Sauerstoffaufnahme des aktiven Skelettmuskels kann im Extremfall bis auf das 100fache ansteigen [77]. Trotz widersprüchlicher Auffassungen in der wissenschaftlichen Literatur belegt die Mehrzahl der Arbeiten, daß physische Belastung zum Anstieg freier Radikale führt [97, 40]. Darüber hinaus besteht auch ein Zusammenhang zwischen erhöhter Radikalbelastung nach Dauerlauf und sarcolemmaler Schädigung mit konsekutiver Freisetzung intracellulärer Proteine [69]. Es ist daher wahrscheinlich, daß die bei 20% der Patienten mit einer *Cytochrom b* – Mutation beschriebenen Episoden von Myoglobinurie bzw. Rhabdomyolyse nach körperlicher Betätigung oder bei einem hochfieberhaften Infekt durch freie Radikale vermittelt sind. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß eine Behandlung mit Vitamin C und Menadion, einem hydrophilen und einem lipophilen Radikalfänger, eine deutliche Besserung der Belastungsinsuffizienz erbrachte [100, 12, 192].

### **Parkinsonoid**

Die Pathogenese der selektiven Schädigung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra beim Morbus Parkinson ist ungeklärt. Es häufen sich experimentelle Befunde, daß es sich dabei um einen radikalvermittelten Schädigungsmechanismus handeln könnte [144, 149]. Vyas *et al.* (1986) entdeckten, daß es sich bei dem Morbus Parkinson verursachenden Toxin MPTP um ein Mitochondrien – schädigendes Agens handelt

[209]. Seither versuchte man, den Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Morbus Parkinson zu sichern. In Cybriden von Parkinson – Erkrankten konnten deutlich mehr Sauerstoffradikale als in Kontrollcybriden nachgewiesen werden. Eine genetische Ursache dafür wurde nicht gefunden. Manche Cybride wiesen auch einen partiellen Komplex I – Mangel auf, wobei unklar blieb, ob es sich dabei um die primäre Pathologie oder um ein sekundäres Phänomen (z.B. durch radikalvermittelte Reduktion der Eisen – Schwefel – Cluster) handelte[75]. Da es nach Blockierung des Komplex III zu einer starken Anflutung von Sauerstoffradikalen kommt [224], würde dies erklären, weshalb ein Parkinsonoid bei 20% der Patienten mit *Cytochrom b* – Mutationen auftritt, während es bei anderen Mitochondriopathien nur selten beobachtet wird.

### WPW – Syndrom

Bei drei Patienten mit *Cytochrom b* – Mutationen wurden wiederholt Episoden paroxysmaler Tachycardie beschrieben. Das Ruhe – EKG des Patienten #7 (Familie E) zeigte eine verkürzte PQ – Zeit und nur gelegentlich eine  $\delta$  – Welle. Ravingerova *et al.* (1999) konnten bei Reperfusions – bedingten Tachyarrhythmien im Rattenherz nachweisen, daß diese durch freie Sauerstoffradikale ausgelöst werden [157]. Ich vermute daher, daß bei diesem Patienten ein ähnlicher Pathomechanismus vorliegt.

### 6.2.6 Septooptische Dysplasie und Komplex III – Mangel

Die septooptische Dysplasie (de Morsier – Syndrom, OMIM#182230) ist eine seltene Erkrankung, die mit einer Hypoplasie der Nervi optici, mit einer Aplasie des Septum pellucidum und gelegentlich mit hypophysären Ausfällen einhergeht [43]. Bei einigen Patienten ähneln die Veränderungen der Fossa posterior einer Dandy – Walker – Malformation [23]. Die meisten Fälle treten spontan auf und sind nicht vererbt [79]. Alle Patienten einer Studie von Willenow *et al.* (1996) waren kleinwüchsig, 93% waren mental retardiert[219]. In einer seltenen Familie mit erblicher Agenesie des Corpus callosum und einem Panhypopituitarismus fanden Dattani *et al.* (1998) eine homozygote Mutation im Homeobox – Gen *HESX1*[39]. In 4% von 89 Patienten mit septooptischer Dysplasie konnten Thomas *et al.* (2001) drei unterschiedliche heterozygote *HESX1* – Mutationen finden, die jedoch nur eine inkomplette Penetranz aufwiesen und zu einem milden Phänotyp führten [188]. In den übrigen 96% blieb der genetische Defekt ungeklärt.

Der Patient #7 erfüllt die Definitionskriterien einer septooptischen Dysplasie: Fehlen des Septum pellucidum, Kleinhirnhypoplasie, Corpus callosum – Hypoplasie, Nervus opticus – Hypoplasie und Kleinwuchs. Wie bei den meisten Patienten mit septooptischer Dysplasie ist dieser Fall spontan aufgetreten, da weder seine Eltern kleinwüchsig sind noch seine Schwester typische Veränderungen im cerebralen MRT aufweist. Leider sind die kernspintomographischen Befunde der meisten in Tabelle 6.3 aufgeführten Patienten in den Publikationen nicht erwähnt. In dem einzigen beschriebenen Fall, in dem ein MRT durchgeführt wurde, fand sich eine diffuse Atrophie beider Großhirnhemisphären und des Kleinhirnes [41]. Ein weiterer Fall mit Komplex III – Mangel und Hypogonadismus wies eine kortikale und cerebelläre Atrophie auf, jedoch keine septooptische Dysplasie [192].

Die Morphogenese des Gehirns innerhalb der frühen Embryonalentwicklung erfordert eine feine Abstimmung zwischen Proliferation und Apoptose [146]. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu Hirnfehlbildungen, insbesondere zu Neuralrohrdefekten, kommen [114]. Es ist weiterhin bekannt, daß freie Radikale durch Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials und durch Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom c Apoptose auslösen können [13]. Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus wurden sowohl beim Menschen als auch beim experimentellen Streptozotocin – induzierten Diabetes mellitus im Tiermodell gehäufte Inzidenzen von fetalen Fehlbildungen, insbesondere von Hirnfehlbildungen beobachtet [78]. Yang et al. (1997) konnten nachweisen, daß erhöhte Glukosespiegel zu einer gesteigerten Bildung von Superoxid im Nervengewebe von Rattenembryos und konsekutiv zu Hirnfehlbildungen führten [30]. Cederberg *et al.* (1997) fanden bei einem diabetischen Rattenstamm, der besonders häufig zu Malformationen neigte, im Vergleich zu einem Fehlbildungs – resistenten diabetischen Rattenstamm erniedrigte Katalase – Aktivitäten [222]. Eine Antioxidantien – Behandlung (Vitamine C und E) diabetischer Ratten mit hoher Fehlbildungsrate führte zu einem hochsignifikanten Rückgang der embryonalen Fehlbildungsrate [177].

Aufgrund der oben referierten Befunde aus tierexperimentellen Untersuchungen ist es möglich, daß die septooptische Dysplasie des Patienten #7 durch Radikale verursacht wurde. Um die Hypothese einer Schädigung durch freie Radikale zu sichern, müßten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei stünde die Bestimmung der Radikalproduktion im Cybrid – System mit unterschiedlichen Heteroplasmiegraden für die 14849T→C – Mutation an erster Stelle [156]. Darüber hinaus wäre es lohnend, bei Patienten mit septooptischer Dysplasie den Antioxidantienstatus zu bestimmen,

nach Mutationen im *Cytochrom b* – Gen und nach einem Komplex III – Mangel in Fibroblasten zu fahnden.

| <i>Cytochrom b</i><br>Mutation                    | Hetero-<br>plasmie-<br>grad [%] | Aminosäure-<br>austausch | Manifesta-<br>tionsalter<br>[Jahre] | Phänotyp  | Laktat ↑<br>im Serum | Publikation                   |
|---|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---|----------------------|-------------------------------|
| 14846G→A  | 85                              | G34S                     | 5                                   | Belastungsinsuffizienz,<br>Muskelschwäche,  | +                    | Andreu <i>et al.</i> [10]     |
| 15059G→A  | 63                              | G44X                     | 7                                   | Belastungsinsuffizienz,<br>Muskelschwäche, Myoglobinurie  | +                    | Andreu <i>et al.</i> [7]      |
| 15084G→A  | 87                              | W113X                    | Kindheit                            | Belastungsinsuffizienz  | +                    | Andreu <i>et al.</i> [10]     |
| 15168G→A  | 70                              | W141X                    | Kindheit                            | Belastungsinsuffizienz,<br>WPW – Syndrom  | +                    | Andreu <i>et al.</i> [10]     |
| 15242G→A  | 87                              | G166X                    | 9                                   | Belastungsinsuffizienz, Epilepsie,<br>visuelle Halluzinationen, Depressi-<br>on, Stroke – like – episode  | +                    | Keightley <i>et al.</i> [100] |
| 15243G→A  | 90                              | G166E                    | 3                                   | hypertrophe Kardiomyopathie, Tod<br>durch Herzversagen im Alter von 9<br>Jahren   | +                    | Valnot <i>et al.</i> [202]    |
| 15498G→A  | 90                              | G251D                    | 0.1                                 | Tod durch Herzstillstand im Alter<br>von 4 Wochen, Kardiomyopathie,<br>Lebersteatose, akute renale Tubulus-<br>nekrose  | ?                    | Andreu <i>et al.</i> [9]      |
| 15615G→A  | 80                              | G290D                    | Kindheit                            | Belastungsinsuffizienz  | +                    | Dumoulin <i>et al.</i> [53]   |
| 15723G→A  | 87                              | W326X                    | Kindheit                            | Belastungsinsuffizienz,<br>Muskelschwäche   | +                    | Andreu <i>et al.</i> [10]     |
| 15762G→A  | 85                              | G339E                    | 25                                  | Belastungsinsuffizienz  | +                    | Andreu <i>et al.</i> [8]      |
| 24 bp Deletion                                    | 50                              | Del251 – 258             | 30                                  | Belastungsinsuffizienz,<br>Muskelschwäche, Myoglobinurie,   | –                    | Andreu <i>et al.</i> [10]     |
| 4bp Deletion                                      | 60                              | Frameshift               | 6                                   | Belastungsinsuffizienz,<br>WPW-Syndrom, Tremor, Spastik,<br>Koordinationsstörung, milde hy-<br>pertrophe Kardiomyopathie, später:<br>Parkinsonoid, Epilepsie, Myoklonus                 | +                    | de Coö <i>et al.</i> [41]     |
| <b>Neue Mutationen</b>                            |                                 |                          |                                     |   |                      |                               |
| 14849T→C  | 64                              | S35P                     | 0,6                                 | Belastungsinsuffizienz, hypertro-<br>phe Kardiomyopathie, WPW –<br>Syndrom, septooptische Dysplasie,<br>Retinitis pigmentosa, Parkinso-<br>noid, Rhabdomyolyse, mentale<br>Retardierung | +                    | diese Arbeit                  |
| <b>Neue Sequenzvarianten ungeklärter Dignität</b> |                                 |                          |                                     |   |                      |                               |
| 15074T→C  | 100                             | S110P                    | 2                                   | Muskelschwäche, Hepatomegalie,<br>mentale Retardierung  | +                    | diese Arbeit                  |
| 15458T→C  | 100                             | S238P                    | 3                                   | Leigh – Syndrom, mentale Retardie-<br>rung, Choreoathetose, Spastik, Myo-<br>klonusepilepsie  | –                    | diese Arbeit                  |

Tabelle 6.8: Übersicht der molekulargenetischen und klinischen Befunde bei Patienten mit Mutationen im *Cytochrom b* – Gen. Die angegebenen Heteroplasmiegrade stammen aus der Analyse von Muskelgewebe. Trotz Mutationen im gleichen Gen besteht eine weite Heterogenität bezüglich des Manifestationsalters und der klinischen Befunde, ohne daß man dies durch den Heteroplasmiegrad allein erklären könnte.

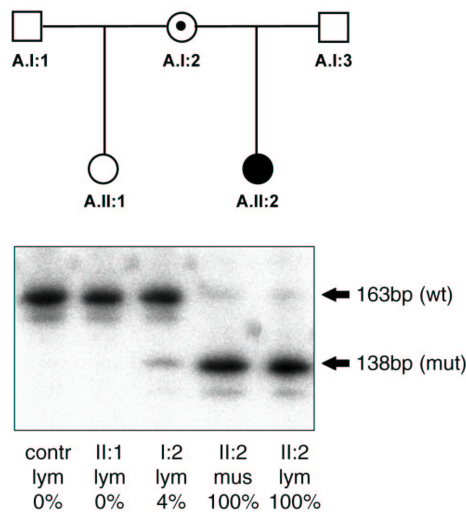


Abbildung 6.17: (A) Stammbaum der Familie A (Kasuistik, S. 29): die Mutter (A.I:2) der Indexpatientin (A.II:2) und die Halbschwester (A.II:1) sind gesund. (B) Restriktionsfragment – Längenanalyse und Quantifizierung der Restriktionsprodukte durch radioaktive 5' – Markierung. Ein 163 bp langer Strang wird beim Vorhandensein der 7472inC – Mutation von *Bsi* YI in zwei Fragmente von 138 und 25 bp geschnitten. Die Patientin A.II:2 weist sowohl im Muskel als auch in peripheren Lymphozyten 100% mutierte mitochondriale DNA auf. Bei der Mutter findet sich nur ein geringer Heteroplasmiegrad von 4%, in den Lymphozyten der Schwester ist keine mutierte mitochondriale DNA nachzuweisen. wt = Wildtyp, mut = Mutante

### 6.3 Ergebnisse des Mutationsscreenings aller mitochondrialer tRNAs mittels eines neu entwickelten Primersets.

Eine große Anzahl pathogener mitochondrialer Mutationen liegt im Bereich der transfer – RNAs. Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoll, für Patienten mit Verdacht auf eine Mitochondriopathie ein Routinescreening anzubieten, das einen Großteil der Mutationsorte abdeckt. Dieses sollte alle tRNAs und darüber hinaus die häufigsten bekannten Punktmutationen in mitochondrial kodierten Strukturgenen des Komplexes I und der ATPase umfassen. Außerdem sollte mittels long – range – PCR nach Deletionen und Duplikationen im mitochondrialen Genom gesucht werden.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelte Primerset (Abschnitt 5.2.4) erlaubt es, in wenigen Multiplex – PCR – Reaktionen alle tRNA – Bereiche der mitochondrialen DNA zu amplifizieren (Abb. 5.1, S. 47). Mit diesem Screening – Set wurden insgesamt 45 Patienten mit klinischem Verdacht auf Mitochondriopathie unter-



sucht. Dabei fanden sich sechs Mutationen. Neben der seltenen und ausführlicher diskutierten Mutation der Familie A fanden sich bei zwei Familien jeweils eine 3243A→G MELAS – und eine 8433A→G MERRF – Mutation. Ein Patient mit Kearns – Sayre – Syndrom wies eine ca. 3.000 bp große Deletion auf.

Bei der Indexpatientin der Familie A (Kasuistik S. 29) bestand biochemisch ein isolierter Komplex IV – Mangel. Daher wurden zunächst die Gene der drei mitochondrial kodierten COX – Untereinheiten sequenziert, in denen bei Patienten mit Komplex IV – Mangel bereits Mutationen gefunden worden waren [101, 98]. Im Gen der COX I – Untereinheit fand sich eine homoplasmische 7270T→C Mutation, die jedoch auch bei den gesunden Familienmitgliedern zu 100% vorlag. Darüber hinaus ist die Aminosäure an dieser Position zwischen den Spezies nicht konserviert, so daß es sich wahrscheinlich um eine nicht pathogene Sequenzvariante handelt. Beim Screening der mitochondrialen tRNAs fand sich dagegen eine seltene homoplasmische Insertionsmutation (7472inC) in der transfer – RNA für Serin (tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>). Die Halbschwester wies keine mutierte mitochondriale DNA auf, bei der Mutter lag ein geringer Heteroplasmiegrad von 4% vor.

Diese Mutation wurde schon in einer großen italienischen Familie mit Ataxie, Myoklonus und Hörstörung beschrieben [190]. Im Gegensatz zu unserer Patientin war jedoch keiner der italienischen Patienten homoplasmisch für diese Mutation. Die Schwere der Erkrankung der italienischen Patienten korrelierte mit dem Heteroplasmiegrad. Insgesamt gesehen war die Erkrankungsschwere in der italienischen Familie milder ausgeprägt als bei unserer Indexpatientin, die an einer Epilepsia partialis continua verstarb.

Es ist anzunehmen, daß die 7472inC Mutation pathogen ist, da sie (1) Heteroplasmie in klinisch nicht betroffenen Familienangehörigen zeigt (z.B. bei der Mutter der Indexpatientin, A.I:2), (2) in einer anderen Familie vorbeschrieben ist, die eine ähnliche Symptomatik aufweist, und (3) in 381 Normalkontrollen nicht gefunden wurde. Die C – Insertion führt wahrscheinlich zu einer Verzerrung der T $\psi$ C – Schleife der tRNA (Abb. 6.18, S. 99). Dies kann zur Folge haben, daß die tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> – Aminoacylierung nicht mehr möglich ist und die Translation an den Stellen abbricht, an denen ein Serin in die Polypeptidkette eingebaut werden müßte. Ein ähnlicher Effekt wurde für die 8344A→G Mutation experimentell bestätigt [57]. Durch diesen Pathomechanismus kann auch der Komplex IV – Mangel bei unserer Patientin erklärt werden. Die mitochondrial kodierte COX I – Untereinheit des Komplexes IV weist insgesamt 32 Seringruppen auf und ist damit das Serin – reichste mitochondrial kodierte Protein. 87,5% dieser Serin-Codons sind vom Typ UCN. Darüber hinaus existieren Hypothe-

sen über den Weg des Protonenflusses durch Komplex IV. Diese Annahmen basieren auf der Kenntnis der röntgenspektroskopisch aufgeklärten dreidimensionalen Struktur des Gesamtkomplexes [199, 200]. In zwei dieser drei hypothetischen Ionenkanäle spielen die Hydroxylgruppen der Serinreste 101, 103, 115, 142, 156, 454 und 461 eine wichtige Rolle. Von diesen Serinresten sind alle bis auf die Gruppe 101 vom UCN – Typ.

Im Gegensatz zur progressiven Myoklonusepilepsie, die bei Mitochondriopathien oft beobachtet wird [174, 141], ist eine Epilepsia partialis continua selten. Sie wurde bisher nur bei einem Patienten mit einem Leigh – Syndrom und einem anderen Patienten mit einem Komplex I – Mangel beschrieben [11, 54]. Man kann daher annehmen, daß bei unserer Patientin der klinische Phänotyp aufgrund der hohen „Mutationsbelastung“ durch die Homoplasmie aggraviert war.

Ein weiteres Symptom unserer Patientin war eine Hörstörung. Interessanterweise sind Hörstörungen bei allen Patienten mit mitochondrialen  $tRNA^{Ser(UCN)}$  – Mutationen in variablem Ausmaß beschrieben. Kürzlich fanden Johnson *et al.* (2001) in Maus – Rückkreuzungsexperimenten heraus, daß eine Unterform der nichtsyndromalen Taubheit auf einer gestörten Interaktion zwischen dem nukleären und dem mitochondrialen Genom beruht [95]. Bei der Ausprägung der Symptome scheint nicht so sehr die Position der Mutation (7445T→C [159, 158], 7497G→A[90] 7512T→C [141], 7510T→C [88]), als vielmehr der Heteroplasmiegrad eine Rolle zu spielen [205].

*Aus diesem Grund ist die Empfehlung gerechtfertigt, bei allen Patienten mit hereditärer Schwerhörigkeit oder Taubheit die mitochondriale  $tRNA^{Ser(UCN)}$  auf Mutationen zu untersuchen. Da mehrere Loci in der  $tRNA^{Ser(UCN)}$  in Frage kommen, eignet sich am besten die oben dargestellte Methode der direkten Sequenzierung.*

Bei der 7472inC – Mutation der Familie A stellt sich die Frage, wie sich innerhalb einer Generation aus einer geringen Heteroplasmie von 4% eine Homoplasmie von 100% entwickeln konnte. Dieser Befund ist von großer Bedeutung für die genetische Beratung von Eltern und für die Pränataldiagnostik und wird in Abschnitt 6.4 diskutiert.

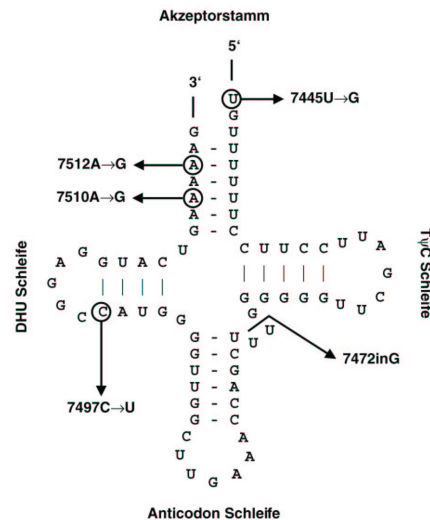


Abbildung 6.18: Lage der bekannte Punktmutationen in der mitochondrialen tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> (7472inG, Familie A). Da diese tRNA vom Gegenstrang (heavy chain) abgelesen wird, sind die mutierten Nukleotide in der Abbildung (im Gegensatz zu der Standardbezeichnung im Text) auf RNA – Ebene dargestellt.

## 6.4 Genetische Beratungssituationen bei Familien mit mitochondrial und nukleär kodierten Atmungskettendefekten.

### 6.4.1 Familie A: die Unmöglichkeit einer pränatalen Abschätzung des Risikos aufgrund der Gewebsheteroplasmie der mtDNA Mutationen

Bei der Indexpatientin der Familie A wurde eine Mutation in tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> der mitochondrialen DNA gefunden. Der Heteroplasmiegrad dieser Mutation verschiebt sich innerhalb einer Generation von 4% bei der Mutter auf eine Homoplasmie von 100% bei der Indexpatientin. Einen ähnlichen Fall mit einer solchen extremen Verschiebung publizierten Degoul *et al.* (1997). Bei einem 2 – jährigen Mädchen fanden sie eine fast homoplasmische mitochondriale 8993T→G – Mutation, die sich weder in mütterlichen Blutzellen noch in Fibroblasten nachweisen ließ [47]. Ob es sich dabei um eine Neumutation handelte oder um eine Verschiebung des Heteroplasmiegrades von unterhalb der Nachweisgrenze bei der Mutter zu annähernd 100% beim Kind blieb in dieser Arbeit ungeklärt. Die Verschiebung einer heteroplasmischen Mutation von <4% hin zu einer Homoplasmie innerhalb einer Generation führt zu folgenden Überlegungen.

- Die aus den mütterlichen Blutzellen extrahierte DNA spiegelt nicht die Verteilung der mutierten mitochondrialen DNA – Kopien im Ovar der Mutter wieder. Der Heteroplasmiegrad in den Oozyten könnte wesentlich höher liegen.
- Jenuth *et al.* (1996) wiesen bei Mäusen nach, daß die schnelle Segregation mitochondrialer Polymorphismen durch einen zufälligen genetischen Drift in der mütterlichen Keimzellbahn erfolgt. Dieser Drift kann aber nur eine Veränderung des Heteroplasmiegrades von 10 – 30% erklären [92]. Legt man die von Jenuth *et al.* gemachten Prämissen auch beim Menschen zu Grunde (200 mitochondriale DNA Kopien in der primären Oozyte, 24 mitotische Teilungen während der Oogenese), lassen sich folgende Wahrscheinlichkeiten berechnen:

Fragestellung: Wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit, daß aus einer primären Oozyte mit 4% mutierter mitochondrialer DNA innerhalb von 24 mitotischen Teilungen  $6 \times 10^6$  sekundäre Oozyten entstehen können, von denen einige homoplasmisch für die Mutation sind, also 100% mutierte mitochondriale DNA enthalten. Die Anzahl der mitochondrialen DNA – Kopien, also der segregierenden Einheiten in der primären Oozyte, soll ca. 200 betragen.

Um eine Oozyte mit 100% mutierter mitochondrialer DNA aus einer primordialen Keimzelle mit 4% mutierter mitochondrialer DNA zu erhalten, muß der Heteroplasmiegrad während jeder der folgenden 24 mitotischen Teilungen um durchschnittlich 4% ansteigen. Die Wahrscheinlichkeit ( $H_m$ ) eines Anstieges um 4% (z.B. von 36% auf 40% Heteroplasmiegrad) kann berechnet werden aus der Anzahl der mitochondrialen DNA Kopien ( $N=200$ ) und der mutierten mitochondrialen DNA – Moleküle der Mutterzelle vor der Zellteilung ( $M=72, \cong 30\%$ ) und der mitochondrialen DNA – Kopien ( $n=100$ ) und der mutierten mitochondrialen DNA – Moleküle in einer der beiden Tochterzellen ( $m=40; \cong 40\%$ ).

Zur Berechnung bedient man sich der „Zufälligen Stichprobenauswahl ohne Zurücklegen“: [180]

$$H_m(N, M; n) = \binom{M}{m} \binom{N-M}{n-m} / \binom{N}{n}$$

mit

$$H_{40}(200, 72; 100) = \binom{72}{40} \binom{128}{60} / \binom{200}{100} \approx 5.88 \times 10^{-2}$$

Der Binominalkoeffizient :  $\binom{a}{b}$  berechnet sich nach:  $\binom{a}{b} = \frac{a!}{b!(a-b)!}$

Die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ), daß sich der Prozentsatz der mutierten mitochondrialen DNA in *jeder* der 24 Zellzyklen um je 4% erhöht ist demnach:

$$p \approx (5.88 \times 10^{-2})^{24} \approx 3 \times 10^{-30}$$

Aus dieser Berechnung wird klar, daß mit den oben angenommenen Prämissen eine Verschiebung von 4% auf 100% innerhalb einer Generation extrem unwahrscheinlich ist. Daraus ist zu folgern, daß entweder die aus dem Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse für den Menschen nicht zutreffen oder daß weitere Faktoren zu beachten sind:

(A) Die statistische Berechnung geht von einer vollständig zufälligen Verteilung der mutierten mitochondrialen DNA – Kopien aus. Dies ist jedoch *in vivo* selten der Fall, da die mutierten Mitochondrien die Tendenz zeigen, wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen bekannt, sich oft an einer Stelle zusammenzulagern. In diesem Fall könnte die Segregation wesentlich schneller verlaufen, und es könnte zu größeren Unterschieden zwischen den Generationen kommen.

(B) Eine weiterer zu beachtender Faktor wäre, daß mutierte mitochondriale DNA bei der Replikation bevorzugt werden kann. Dies wurde in Muskelgewebe bereits mehrfach beschrieben [223, 214]. Auch dann könnte die Segregation zur Homoplasmie schneller als vermutet voranschreiten.

Aus diesen Untersuchungen wird ersichtlich, daß Müttern mit nachgewiesener mitochondrialer DNA – Mutation in einer genetischen Beratung keine vernünftige Risikoabschätzung angeboten werden kann. Als einziger Ausweg käme hier die Präimplantationsdiagnostik in Frage. Briggs *et al.* (2000) entwickelten eine elegante Methode, die es erlaubt, den Heteroplasmiegrad einer noch unbefruchteten Oozyte zu bestimmen. Die für die Funktion der Oozyte irrelevanten Polkörperchen enthalten mutierte und nichtmutierte mitochondriale DNA in einem der Oozyte sehr ähnlichen Verhältnis. Sie können entfernt und ihr Heteroplasmiegrad kann mit sensitiven quantitativen PCR – Techniken bestimmt werden. Somit sind Vorhersagen über eine individuelle Oozyte möglich, die dann *in vitro* befruchtet oder verworfen werden kann [25].

#### **6.4.2 Familie B: Fehler in der Pränataldiagnostik durch Zellkulturartefakte**

Familie B (Kasuistik S. 31, Stammbaum S. 65) wünschte nach der Geburt der Indexpatientin in der folgenden Schwangerschaft eine Pränataldiagnostik. Zum damaligen Zeitpunkt war die nukleär kodierte 632C→T Mutation des *NDUFVI* – Gens noch nicht bekannt, so daß die Diagnostik allein auf der biochemischen Messung der Komplex I – Aktivitäten beruhte. Die Resultate waren widersprüchlich, da die nativen Chorionzotten normale, die gezüchteten Chorionzotten jedoch pathologisch erniedrigte Komplex

I – Aktivitäten aufwiesen (Tab. 6.9, S. 102). Da die Eltern einen hohen Grad an Sicherheit wünschten, wurde die Schwangerschaft abgebrochen. Die Aktivität des Komplexes I im fetalen Muskel war jedoch normal.

Aufgrund dieser diskrepanten Befunde wurden die Messungen an dem bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten fetalen Muskelgewebe und gezüchteten Chorionzellen wiederholt, aber die Messung bestätigte die ursprünglichen Ergebnisse. Daraufhin suchte ich in der DNA des abortierten Feten nach der 632C $\rightarrow$ T Mutation. Es fand sich eine Heterozygotie (Abb. 6.8, S. 65), die mit dem normalen biochemischen Ergebnis des fetalen Muskels im Einklang stand. Heterozygote Individuen weisen keinen biochemisch messbaren Komplex I – Mangel auf [126]. Dies konnte durch die Bestimmung normaler Komplex I – Aktivitäten in den Fibroblasten der Eltern bestätigt werden. Milunski & Cheney (1999) entdeckten in 3 von 24 Chorionzottenbiopsien mütterliche Zellen und schlossen daraus, daß die mikroskopische Inspektion des Biopsates nicht ausreicht, um eine Kontamination durch mütterliche Zellen auszuschließen [134]. Daher verglich ich den genetischen Fingerabdruck von 10 polymorphen Mikrosatellitenmarkern der Mutter und des fetalen Muskelgewebes mit dem der gezüchteten Chorionzotten und fand, daß die gezüchteten Chorionzotten ausschließlich den maternalen Genotyp aufwiesen. Diese Zellen, die wahrscheinlich der maternalen Dezidua entstammen, hatten nach mehreren Passagen in der Zellkultur die fetalen Zellen verdrängt.

|                             | Material                          | Komplex I |             | Komplex II+III |             | Komplex IV |              |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------|-------------|----------------|-------------|------------|--------------|
| Familie B                   |                                   |           |             |                |             |            |              |
| Indexpatient (B.II:1)       | gezüchtete Fibroblasten §         | 51        | (100-260) * | 234            | (210-440) * | 941        | (680-1190) † |
|                             | Muskel •                          | 24        | (84-273) †  |                |             | 1748       | (520-2080) † |
| 2. Schwangerschaft (B.II:2) | native Chorionzotten •            | 131       | (84-263) †  |                |             | 512        | (271-922) †  |
|                             | <u>gezüchtete Deziduazellen §</u> | 120       | (220-300) * | 270            | (190-530) * | 830        | (500-860) †  |
|                             | Muskel (abortierter Fetus) •      | 108       | (84-273) †  |                |             | 1119       | (520-2080) † |
| 3. Schwangerschaft (B.II:3) | native Chorionzotten •            | 160       | (84-263) †  |                |             | 550        | (271-922) †  |
|                             | gezüchtete Chorionzotten §        | 290       | (220-330) * | 468            | (190-530) * | 505        | (500-860) †  |
| Normalkontrollen (n=5)      | native Deziduazellen •            |           | 122-414 †   |                |             | 122-208 †  |              |
| Normalkontrollen (n=3)      | gezüchtete Deziduazellen §        |           | 220-300 *   |                |             | 540-640 †  |              |
| Mutter (B.I:1)              | gezüchtete Fibroblasten §         | 275       | (100-260) * |                |             |            |              |
| Vater (B.I:2)               | gezüchtete Fibroblasten §         | 218       | (100-260) * |                |             |            |              |

Tabelle 6.9: Atmungskettenkomplex – Aktivitäten der Familie B. \* Ergebnisse dargestellt als mU/U Cytochrom c Oxidase – Aktivität, † Ergebnisse dargestellt als mU/U Citratsynthase – Aktivität, § Aktivitätsmessung in einer Mitochondrien – angereicherten Fraktion, • Aktivitätsmessung im Gewebshomogenat. Die Normwerte sind nicht normalverteilt, daher ist hinter jedem Meßwert in Klammern der 5-95 Perzentilenbereich des Normalkollektivs angegeben.

Dieser Befund erklärt aber nicht die erniedrigte Komplex I – Aktivität in diesen Zellen, die eigentlich normal sein müßte, da sie heterozygot sind.

Um herauszufinden, ob die biochemischen Normalwerte gezüchteter Deziduazellen von denen der gezüchteten Chorionzellen abweichen, wurden mütterliche Deziduazellen aus Chorionzottenbiopsien angezüchtet, die in der Routinediagnostik gewonnen worden waren, z.B. zum Ausschluß von Chromosomenaberrationen. Die Komplex I – Aktivität der gezüchteten Deziduazellen der 2. Schwangerschaft war auch im Hinblick auf diese Normwerte pathologisch erniedrigt (Tab. 6.9, S. 102), so daß man annehmen muß, daß Zellkultur – Artefakte die Atmungsketten – Aktivitäten der Zellen beeinflußt hatten. In ca. 2% der Fälle ist in Chorionzotten ein chromosomales Mosaik nachweisbar [185], welches aber im vorliegenden Fall durch die Karyotypisierung ausgeschlossen werden konnte.

Da die Mutation zum Zeitpunkt der 3. Schwangerschaft bekannt war, konnten alle zur Verfügung stehenden Methoden zur Pränataldiagnostik eingesetzt werden. Die Ergebnisse waren nun miteinander vereinbar. (1) Sowohl die nativen als auch die gezüchteten Chorionzotten waren fetaler Herkunft, (2) der Genotyp für die 632C→T Mutation war heterozygot, (3) die Komplex I – Aktivitäten waren in allen gemessenen Zellen normal. Das inzwischen 2 – jährige Kind ist gesund.

Der vorliegende Fall demonstriert die Schwierigkeiten einer Pränataldiagnostik, die nur auf biochemischen Untersuchungen beruht. Zur Verbesserung der diagnostischen Sicherheit sollten folgende Punkte beachtet werden:

- Bevor den Eltern eine Pränataldiagnostik angeboten werden kann, muß sichergestellt sein, daß der biochemische Defekt sowohl im Muskel als auch in den Fibroblasten des Indexpatienten nachweisbar ist.
- Es genügt nicht, die Kontamination durch mütterliche Zellen nach Entnahme einer Chorionzottenbiopsie durch Sichtkontrolle im Lichtmikroskop auszuschließen.
- Alle molekulargenetisch und biochemisch untersuchten Proben müssen per Haplotypisierung mit mehreren Mikrosatellitenmarkern auf ihre genetische Identität hin überprüft werden. In der Zellkultur können wenige, aber schneller wachsende mütterliche Zellen in kurzer Zeit die Kultur dominieren, insbesondere dann, wenn die fetalen Zellen aufgrund eines Atmungskettendefektes langsamer wachsen.



- Es ist zu bedenken, daß die Atmungskettenaktivitäten der gezüchteten Zellen durch nicht identifizierte, spezielle Zellkultur – Faktoren beeinflußt werden können. Um diese Artefakte zu minimieren, sollten die Zellkulturbedingungen der Normalkontroll – Zellen und der zu messenden Zellen identisch sein.
- Ein sicheres Ergebnis der Pränataldiagnostik kann den Eltern nur dann mitgeteilt werden, wenn die biochemischen Befunde aus nativen und gezüchteten Zellen übereinstimmen.

# Zusammenfassung und Ausblick

Mitochondrien haben eine entscheidende Rolle im Zellmetabolismus, da sie den Hauptort der ATP – Produktion darstellen. Störungen des mitochondrialen Metabolismus sind mit einem weiten Spektrum von Erkrankungen und betroffener Organsysteme assoziiert. Das Gehirn und die Muskulatur sind aufgrund ihres hohen Energiebedarfs so regelhaft betroffen (Epilepsie, Ataxie, Myopathie), daß die Mitochondriopathien zum Fachgebiet des Neuropädiatrie zählen.

Die Vererbung mitochondrialer Erkrankungen wird durch mehrere, den Mitochondrien eigentümliche Faktoren bestimmt: (1) Eine Zelle enthält tausende Mitochondrien und eine entsprechende Anzahl von Kopien mitochondrialer Genome. (2) Mutationen können nur einen Teil der Mitochondrien einer Zelle betreffen und zur Koexistenz zweier oder mehrerer mitochondrialer Genotypen innerhalb der gleichen Zelle führen, wobei der Prozentsatz mutierter Kopien oft die Schwere des Krankheitsbildes beeinflußt. (3) Sie werden im Falle mitochondrialer DNA – Mutationen maternal vererbt. (4) Die Mehrheit mitochondrialer Proteine wird durch die nukleäre DNA kodiert, deren Vererbungsmodus den Mendel'schen Gesetzen folgt.

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse aus miteinander verbundenen Forschungsprojekten vorgestellt, in welchen sowohl klinische und neurophysiologische als auch biochemische und molekulargenetische Methoden zur Anwendung kamen. Die Patienten stammten aus der eigenen neuropädiatrischen Sprechstunde der Charité, aus dem „Nijmegen Center for Mitochondrial Diseases“ und von einsendenden Kollegen aus Deutschland und Europa. Insgesamt wurden 108 Patienten und in der Mehrzahl der Fälle auch ihre Familienmitglieder untersucht.

In der Arbeit wurden mehrere Ziele verfolgt:

- An erster Stelle stand die Auffindung genetischer Ursachen der häufigsten Mitochondriopathie, des isolierten Komplex I – Mangels. Zu Beginn der Arbeit (1997)

waren noch keine nukleär kodierten Gendefekte bekannt. Es war daher zu vermuten, daß Patienten mit einem biochemisch nachgewiesenen, isolierten Komplex I – Mangel einen Gendefekt in einer der strukturellen Untereinheiten dieses Atmungskettenkomplexes aufweisen mußten. Da die NDUFV1 – Untereinheit die „Eintrittspforte“ der Elektronen in den Komplex I darstellt, ist sie funktionell besonders wichtig. Aus diesem Grunde konzentrierte ich meine genetische Suche auf diese Untereinheit, deren genomische Struktur beim Menschen vorher nicht bekannt war.

Zuerst bestimmte ich die vollständige cDNA und genomische Sequenz des menschlichen NDUFV1 – Gens mit seinen 10 Exons einschließlich aller Intronsequenzen. Das offene Leseraster des Gens ist 1392 bp lang und weist eine hohe Homologie zwischen allen eukaryontischen Spezies auf. Funktionell wichtige Domänen des Proteins sind bis zu *Escherichia coli* konserviert. Es fand sich darüber hinaus eine Antisense – Homologie zwischen der Sequenz des NDUFV1 und der Sequenz des  $\gamma$  – Interferon induzierbaren Proteins IP30, so daß eine immunmodulatorische Wirkung des NDUFV1 – Gens denkbar ist.

Ich untersuchte 30 Patienten mit isoliertem Komplex I – Mangel, die mit Verdacht auf eine Mitochondriopathie an das „Nijmegen Center for Mitochondrial Diseases“ überwiesen worden waren. In 4 Fällen fand ich neue Mutationen im NDUFV1 – Gen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, diesen Familien eine präzise genetische Beratung und Pränataldiagnostik zukommen zu lassen.

- Das zweite Thema dieser Arbeit ist die klinische und genetische Charakterisierung einer Gruppe von 33 Patienten mit Komplex III – Mangel. Die Patienten wurden mittels eines Erhebungsbogens hinsichtlich ihrer Symptome evaluiert. Die klinischen Symptome waren jedoch so heterogen, daß keine für einen Komplex III – Mangel typischen Symptomenkonstellationen herausgearbeitet werden konnten.

Bei der Sequenzierung des *Cytochrom b* – Gens dieser 33 Patienten fand ich bei einem Patienten eine sicher pathogene Mutation und bei zwei weiteren Patienten neue Sequenzvarianten, deren Pathogenität nicht zu klären war. Der erste Patient hatte neben dem Komplex III – Mangel eine septooptische Dysplasie. Bei diesem Krankheitsbild wurde bisher eine Mutation im *HESX1* – Gen nachgewiesen, die jedoch nur in 4% der Fälle als Ursache in Frage kommt. Die septooptische Dysplasie unseres Patienten mit einer mitochondrialen *Cytochrom b* – Mutation

und einem Komplex III – Mangel läßt vermuten, daß ein neuer pathogenetischer Mechanismus beteiligt sein muß (z.B. Schädigung durch freie Radikale).

- Das dritte Ziel meiner Arbeit war die Vereinfachung und Beschleunigung der Mutationsdetektion in der mitochondrialen DNA. Die meisten durch die mitochondriale DNA vererbten Erkrankungen sind durch Mutationen der mitochondrialen tRNAs bedingt. Ich entwickelte eine kostengünstige und einfach zu handhabende Methode zur Sequenzierung aller tRNAs in einem Multiplex – Assay. Darüber hinaus entwickelte ich eine Methode, welche Genotypisierungen mit Fluoreszenzmarkern zu einem Bruchteil der bisher üblichen Kosten erlaubt und beim Deutschen Patentamt zum Patent angemeldet wurde.

Bei der Untersuchung von 45 zuvor biochemisch nicht klassifizierten Patienten, bei denen aufgrund klinischer Symptome oder einer Laktatazidose der Verdacht auf eine Mitochondriopathie bestand, fand ich 6 Mutationen in der mitochondrialen DNA. Bei einer davon zeigte sich eine Erhöhung des Heteroplasmiegrades zwischen den Generationen von 4% auf 100%. Dies bedeutet, daß selbst Mütter mit niedrigem Heteroplasmiegrad in somatischen Zellen ein derzeit nicht genau abzuschätzendes Risiko aufweisen, homoplasmisch erkrankte Kinder zu bekommen.

Neben den molekulargenetischen Ergebnissen lassen sich aus der Arbeit eine Reihe von Empfehlungen für Genetiker und Pädiater hinsichtlich Diagnostik und genetischer Beratung bei mitochondrialen Erkrankungen ableiten.

1. Bei Patienten mit hereditärer nicht – syndromaler Schwerhörigkeit oder Taubheit sollte außer nach Mutationen in nukleären Genen und der mitochondrialen 1555A→G – Mutation auch mittels direkter Sequenzierung nach Mutationen in der tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gefahndet werden.
2. Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie sollten auf einen Komplex III – Mangel und auf *Cytochrom b* – Mutationen untersucht werden. Ein positiver Mutationsnachweis hat therapeutische Konsequenzen, da Patienten günstig auf eine Therapie mit Menadion und Ascorbinsäure reagieren.
3. Wünschen Eltern eine Pränataldiagnostik ohne bekannten primären Gendefekt, kann diese unter Beachtung einiger Vorsichtsmaßnahmen auf biochemischem Wege erfolgen: (1) Der biochemische Defekt muß in mindestens zwei Geweben

des Indexpatienten nachweisbar sein. (2) Es genügt nicht, die Chorionzottenbiopsie lichtmikroskopisch auf Kontamination mit mütterlichem Gewebe zu untersuchen. (3) Alle untersuchten Proben müssen per Haplotypisierung mit mehreren Mikrosatellitenmarkern auf ihre genetische Identität überprüft werden. In der Zellkultur können wenige, aber schneller wachsende mütterliche Zellen in kurzer Zeit die Kultur dominieren, insbesondere dann, wenn die fetalen Zellen aufgrund eines Atmungskettendefektes langsamer wachsen. (4) Ein sicheres Ergebnis der Pränataldiagnostik kann den Eltern nur dann mitgeteilt werden, wenn die biochemischen Befunde aus nativen und gezüchteten Zellen übereinstimmen.

Es ist zu erwarten, daß in der nächsten Zeit immer mehr Gene beschrieben werden, deren Störungen mit Mitochondriopathien einhergehen. Eine Sequenzierung all dieser Kandidatengene bei Patienten mit vermuteter Mitochondriopathie wird einen nicht mehr zu bewältigenden Aufwand darstellen. Hier wäre eine Methode wünschenswert, die einen Blick auf alle mitochondrialen Proteine „aus der Vogelperspektive“ ermöglicht, um potentielle Erkrankungsgene aufzuspüren und gezielt zu sequenzieren. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. J. Klose (Institut für Humangenetik der Humboldt Universität Berlin) möchte ich im Rahmen eines BMBF – Projektes ein Verfahren entwickeln, mit dem sich die Proteine einer gereinigten subzellulären Mitochondrienfraktion in einer hochauflösenden 2D – Gelelektrophorese darstellen lassen [110]. Proteine, die vom Laufverhalten der Normalkontrollen abweichen, werden dann mittels MALDI – TOF – Massenspektrometrie identifiziert und molekulargenetisch untersucht. Durch die Integration von „Genomics“ und „Proteomics“ versprechen wir uns neben der Verbesserung der Diagnostik auch grundlegende Erkenntnisse zur mitochondrialen Geninteraktion und – regulation.

# Literaturverzeichnis

- [1] World medical association declaration of helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 284:3043–3045., 2000.
- [2] S. P. Albracht, A. Mariette, and P. de Jong. Bovine–heart nadh:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 fe–s clusters and 2 fm–groups. *Biochim Biophys Acta*, 1318:92–106, 1997.
- [3] S. T. Ali, A. M. V. Duncan, K. Schappert, H. H. Q. Heng, L. C. Tsui, W. Chow, and B. H. Robinson. Chromosomal localization of the human gene encoding the 51–kda subunit of mitochondrial complex i (ndufv1) to 11q13. *Genomics*, 18:435–439, 1993.
- [4] R. Altmann. *Die Elementarorganismen und ihre Beziehung zu den Zellen*. Leipzig, 1890.
- [5] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403–410, 1990.
- [6] S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, and I. G. Young. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457–465, 1981.
- [7] A. L. Andreu, C. Bruno, T. C. Dunne, K. Tanji, S. Shanske, C. M. Sue, S. Krishna, G. M. Hadjigeorgiou, A. Shtilbans, E. Bonilla, and S. DiMauro. A nonsense mutation (g15059a) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol*, 45:127–130, 1999.
- [8] A. L. Andreu, C. Bruno, S. Shanske, A. Shtilbans, M. Hirano, S. Krishna, L. Hayward, D. S. Systrom, R. H. Brown, and S. DiMauro. Missense muta-

- tion in the mtdna cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*, 51:1444–1447, 1998.
- [9] A. L. Andreu, N. Checcarelli, S. Iwata, S. Shanske, and S. DiMauro. A missense mutation in the mitochondrial cytochrome b gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Ped Res*, 48:311–314, 1999.
- [10] A. L. Andreu, M. G. Hanna, H. Reichmann, C. Bruno, A. S. Penn, K. Tanji, F. Pallotti, S. Iwata, E. Bonilla, B. Lach, J. Morgan-Hughes, and S. DiMauro. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial dna. *New Engl J Med*, 341:1037–1044, 1999.
- [11] C. Antozzi, S. Franceschetti, G. Filippini, B. Barbiroli, M. Savoiaro, F. Fiacchino, M. Rimoldi, R. Lodi, P. Zaniol, and M. Zeviani. Epilepsia partialis continua associated with nadh–coenzyme q reductase deficiency. *J Neurol Sci*, 129:152–161, 1995.
- [12] Z. Argov, W. J. Bank, J. Maris, S. eleff, N. G. Kennaway, R. E. Olson, and B. Chance. Treatment of mitochondrial myopathy due to complex iii deficiency with vitamins k<sub>3</sub> and c: a <sup>31</sup>p–nmr follow-up study. *Ann Neurol*, 19:598–602, 1986.
- [13] A. Atlante, P. Calissano, A. Bobba, A. Azzariti, E. Marra, and S. Passarella. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ros)–dependent fashion and can operate as a ros scavenger and as respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing apoptotic death. *J Biol Chem*, 275:37159–37166, 2000.
- [14] J. Bautista, R. Corpas, R. Ramos, O. Cremades, J. F. Gutierrez, and S. Alegre. Brain mitochondrial complex i inactivation by oxidative modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 275:890–894, 2000.
- [15] MW Becher, ML Wills, WW Noll, O Hurko, and DL Price. Kearns–sayre syndrome with features of pearson’s marrow–pancreas syndrome and a novel 2905–base pair mitochondrial dna deletion. *Hum Pathol*, 30:577–581, 1999.
- [16] C Benda. Weitere mitteilungen ber die mitochondria. *Verh Physiol Ges*, 1:376–383, 1898.



- [17] H. Bentlage, U. Wendel, H. Schgger, H. ter Laak, A. Jannsen, and F. Trijbels. Lethal infantile mitochondrial disease with isolated complex i deficiency in fibroblasts with combined complex i and iv deficiencies in muscle. *Neurology*, 47:243–248, 1996.
- [18] J. E. Bernal, O. Winz, and M. Tamayo. *The Kearns–Sayre syndrome in three members of a consanguineous Colombian family (Abstract)*. 7. Internationaler Kongress fr Humangenetik, Berlin, 1986.
- [19] E. Boitier, F. Degoul, I. Desguerre, C. Charpentier, D. Fancois, G. Ponsot, M. Diry, P. Rustin, and C. Marsac. A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme q<sub>10</sub> deficiency. *J Neurol Sci*, 156:41–46, 1998.
- [20] T. Bourgeron, P. Rustin, D. Chretien, M. Birch-Machin, M. Bourgeois, E. Viegas-Pequignot, A. Munnich, and A. Rtig. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*, 11:144–148, 1995.
- [21] M. F. Bouzidi, H. Carrier, and C. Godinot. Antimycin resistance and ubiquinol cytochrome *c* reductase instability associated with a human cytochrom *b* mutation. *Biochim Biophys Acta*, 1317:199–209, 1996.
- [22] C. Branden and J Tooze. *Introduction to protein structure*. Garland Publishing, New York, London, 1991.
- [23] J. D. Brenner, M. W. Preslan, E. Gratz, J. Joslyn, M. Schwartz, and S. Kelman. Septo–optic dysplasia in tow siblings. *Am J Ophthal*, 109:632–637, 1990.
- [24] M. Brenner, A. B. Johnson, O. Boespflug-Tanguy, D. Rodriguez, J. E. Goldmann, and A. Messing. Mutations in gfap, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with alexander disease. *Nat Genet*, 27:117–120, 2001.
- [25] D. A. Briggs, N. J. Power, V. Lamb, A. J. Rutherford, and R. G. Gosden. Amplification of dna sequences in polar bodies from human oocytes for diagnosis of mitochondrial disease. *Lancet*, 355:1520–1521, 2000.
- [26] M. D. Brown, A. S. Voljavec, M. T. Lott, A. Torroni, C. C. Yang, and D. C. Wallace. Mitochondrial dna complex i and iii mutations associated with leber’s hereditary optic neuropathy. *Genetics*, 130:163–173, 1992.

- [27] X. Bu and J. I. Rotter. X chromosome linked and mitochondrial gene control of leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on x chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:8198–8202, 1991.
- [28] S Budde, L van den Heuvel, A Janssen, R. Smeets, C. Buskens, L. DeMeirleir, R. van Coster, M. Baethmann, T. Voit, J. Trijbels, and J. Smeitink. Combined enzymatic complex i and iii deficiency associated with mutations in the nuclear encoded *ndufs4* gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 275:63–68, 2000.
- [29] Y. Campos, J. Arenas, A. Cabello, and J. J. Gomez-Reino. Respiratory chain enzyme defects in patients with idiopathic inflammatory myopathy. *Ann Rheum Dis*, 54:491–493, 1995.
- [30] J. Cederberg and U. J. Eriksson. Decreased catalase activity in malformation-prone embryos of diabetic rats. *Teratology*, 56:350–357, 1997.
- [31] A. Chechnik, L. Diachenko, F. Moqadam, V. Tarabykin, S. Lukvanov, and P. D. Siebert. Full length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor ligated cDNA. *Biotechniques*, 21:526–534, 1996.
- [32] M. Chevallet, A. Dupuis, J. Lunardi, R. van Belzen, S. P. Albracht, and J. P. Issartel. The nuoI subunit of *Rhodospirillum rubrum* (equivalent to the bovine cytochrome *b*<sub>5</sub> subunit) is required for proper assembly of the membrane and peripheral domains of the enzyme. *Eur J Biochem*, 250:451–458, 1997.
- [33] P. F. Chinnery, M. A. Johnson, T. M. Wardell, R. Singh-Kler, C. Hayes, D. T. Brown, R. W. Taylor, L. A. Bindoff, and D. M. Turnbull. The epidemiology in pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*, 48:188–193, 2000.
- [34] J.M. Clark, M.P. Marks, E. Adalsteinsson, D.M. Spielman, D. Shuster, D. Horoupian, and G.W. Albers. Melas: clinical and pathologic correlations with MRI, xenon/CT, and MR spectroscopy. *Neurology*, 46:223–227, 1996.
- [35] M. G. Claros and P. Vincens. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, 241:779–786, 1996.

- [36] M. G. Claros and G. von Heijne. Toppred ii: an improved software for membrane protein structure predictions. *Cabios Application Notes*, 10:685–686, 1994.
- [37] E. M. Conner and M. B. Grisham. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12:274–277, 1996.
- [38] R. G. H. Cotton and C. R. Scriver. Proof of „disease causing“ mutation. *Hum Mutat*, 12:1–3, 1998.
- [39] M. T. Dattani, J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, J. M. Brickmann, R. Gupta, I. L. Martensson, H. Toresson, M. Fox, J. K. H. Wales, P. C. Hindmarsh, S. Krauss, R. S. P. Beddington, and I. C. A. F. Robinson. Mutations in the homeobox gene *hes1/hesx1* associated with septo–optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet*, 19:125–133, 1998.
- [40] K. J. Davies, A. T. Quintanilha, G. A. Brooks, and L. Packer. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem biophys Res Commun*, 107:1198–1205, 1982.
- [41] I. F. M. de Coo, W. O. Renier, W. Ruitenbeek, H. J. ter Laak, M. Bakker, H. Schgger, B. A. van Oost, and H. J. M. Smeets. A 4–base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/melas overlap syndrome. *Ann Neurol*, 45:130–133, 1999.
- [42] R. de Coo, P. Buddiger, H. Smeets, A. G. van Kessel, J. Morgan-Hughes, D. O. Weghuis, J. Overhauser, and B. van Oost. Molecular cloning and characterization of the active human mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase 24–kda gene (*ndufv2*) and its pseudogene. *Genomics*, 26:461–466, 1995.
- [43] G. de Morsier. Median craniocephalic dysraphias and olfactogenital dysplasia. *World Neurol*, 3:485–506, 1962.
- [44] D. C. De Vivo. The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain Dev*, 15:1–22, 1993.
- [45] D. de Vries, I. de Wijs, W. Ruitenbeek, J. Begeer, P. Smit, H. Bentlage, and B. van Oost. Extreme variability of clinical symptoms among sibs in a melas family correlated with heteroplasmy for the mitochondrial a3243g mutation. *J Neurol Sci*, 124:77–82, 1994.

- [46] D. D. de Vries, B. G. M. van Engelen, F. J. M. Gabreels, W. Ruitenbeek, and B. A. van Oost. A second missense mutation in the mitochondrial atpase 6 gene in leigh's syndrome. *Ann Neurol*, 34:410–412, 1993.
- [47] F. Degoul, D. Francois, M. Diry, G. Ponsot, I. Desguerre, B. Heron, C. Marsac, and M. L. Moutard. A near homoplasmic t8993g mtdna mutation in a patient with atypic leigh syndrome not present in the mother's tissues. *J Inher Metab Dis*, 20:49–53, 1997.
- [48] P. S. K. Deng, Y. Hatefi, and S. Chen. N-arylazido- $\beta$ -alanyl-nad<sup>+</sup>, a new nad<sup>+</sup> photoaffinity analogue. synthesis and labeling of mitochondrial nadh dehydrogenase. *Biochemistry*, 29:1094–1098, 1990.
- [49] J. P. di Rago and A. M. Colson. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, q-cycle inhibitors acting at the q<sub>i</sub> site in the mitochondrial qubiquinol-cytochrome c reductase in saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*, 263:12564–12570, 1988.
- [50] S. DiMauro and A. L. Andreu. Mutations in mtdna: Are we scraping the bottom of the barrel? *Brain Pathol*, 10:431–441, 2000.
- [51] S. DiMauro and D. C. De Vivo. Genetic heterogeneity in leigh syndrome. *Ann Neurol*, 40:5–7, 1996.
- [52] C. Dionisi-Vici, S. Seneca, M. Zeviani, G. Fariello, M. Rimoldi, E. Bertini, and L. de Merleir. Fulminant leigh syndrome and sudden unexpected death in a family with the t9176c mutation of the mitochondrial atpase 6 gene. *J Inher Metab Dis*, 21:2–8, 1998.
- [53] R. Dumoulin, I. Sagnol, T. Ferlin, D. Bozon, G. Stepien, and B. Mousson. A novel gly290asp mitochondrial cytochrome b mutation linked to a complex iii deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol Cell Probe*, 10:389–391, 1996.
- [54] M. Elia, S. A. Musumeci, R. Ferri, V. Colamaria, G. Azan, D. Greco, and M. C. Stefanini. Leigh syndrome and partial deficit of cytochrome c oxidase associated with epilepsia partialis continua. *Brain Dev*, 18:207–211, 1996.
- [55] W. K. Engel and C. G. Cunningham. Rapid examination of muscle tissue; an improved trichrome stain method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology*, 13:919–923, 1963.

- [56] D. M. Engelman, T. A. Steitz, and A. Goldman. Identifying nonpolar transbilayer helices into amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 15:321–353, 1986.
- [57] J. A. Enriquez, A. Chomyn, and G. Attardi. mtdna mutation in merff syndrome causes defective aminoacylation of trna<sup>Lys</sup> and premature translation termination. *Nat Genet*, 10:47–55, 1995.
- [58] L. Ernester, D. Ikkos, and R. Luft. Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature*, 184:1851–1854, 1959.
- [59] M. J. Evans, C. Gurer, J. D. Loike, I. Wilmut, A. E. Schnieke, and E. A. Schon. Mitochondrial dna genotypes in nuclear transfer–derived cloned sheep. *Nat Genet*, 23:90–92, 1999.
- [60] I. M. Fearnley and J. E. Walker. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex i and their relationship with other proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1140:105–134, 1992.
- [61] M. Finel, A. S. Majander, J. Tyynel, A. M. P. de Jong, S. P. J. Albracht, and M. Wikström. Isolation and characterization of subcomplexes of the mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase (complex i). *Eur J Biochem*, 226:237–242, 1994.
- [62] M. Finel, M. Skehel, S. P. J. Albracht, I. M. Fearnley, and J. E. Walker. Resolution of nadh:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry*, 31:11425–11434, 1992.
- [63] N. Fischel-Godsian, M. C. Bohlman, T. R. Prezant, J. M. Graham, S. D. Cederbaum, and M. J. Edwards. Deletion in blood mitochondrial dna in kearns–sayre syndrome. *Pediat Res*, 31:557–560, 1992.
- [64] J.C. Fischer, W. Ruitenbeek, A.J.M. Janssen, W.O. Renier, R.C.A. Sengers, A.M. Stadhouders, H.J. ter Laak, J.M.F. Trijbels, and J.H. Veerkamp. A mitochondrial encephalomyopathy: the first case with an established defect at the level of coenzyme q. *Eur J Pediatr*, 144:441–444, 1986.

- [65] M. A. Frohman, M. K. Dush, and G. R. Martin. Rapid production of full-length cdnas from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:8998–9002, 1988.
- [66] N. Fukuhara, S. Tokiguchi, K. Shirakawa, and T. Tsubaki. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? light- and electron-microscopic studies of two cases and a review of the literature. *J Neurol Sci*, 47:117–133, 1980.
- [67] Y. M. Galante and Y. Hatefi. Purification and molecular and enzymatic properties of mitochondrial nadh dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 192:559–568, 1979.
- [68] B. Glick and G. Schatz. Import of proteins into mitochondria. *Annu Rev Genet*, 25:21–44, 1991.
- [69] C. Goodman, G. Henry, b. Dawson, I. Gillam, S. Ching, V. Fabian, D. Dasig, B. Kakulas, and P. Morling. Biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after twenty-one kilometre run. *Aus J Sci Med Sport*, 29:95–98, 1997.
- [70] Y. Goto, I. Nonaka, and S. Horai. A mutation in the trna<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the melas subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348:651–653, 1990.
- [71] Y. Goto, I. Nonaka, and S. Horai. A new mtdna mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (melas). *Biochim Biophys Acta*, 1097:238–240, 1991.
- [72] Y. Goto, K. Tsugane, Y. Tanabe, I. Nonaka, and S. Horai. A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial trnaleu(uur) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (mels). *Biochem Biophys Res Commun*, 202:1624–1630, 1994.
- [73] N. Grigorieff. Three-dimensional structure of bovine nadh:ubiquinone oxidoreductase (complex i) at 22 Å in ice. *J Mol Biol*, 277:1033–1046, 1998.
- [74] T.I. Gropen, I. Prohovnik, T.K. Tatemichi, and M. Hirano. Cerebral hyperemia in melas. *Stroke*, 25:1873–1876, 1994.

- [75] M. Gu, J. M. Cooper, and A. H. V. Schapira. Genomic transplantation to determine the molecular basis and pathogenic role of complex i in parkinson's disease. *Mov Disord*, 12, Suppl:5, 1997.
- [76] A. Guidarelli, L. Brambilla, C. Rota, A. Tomasi, F. Cattabeni, and O. Cantoni. The respiratory-chain poison antimycin a promotes the formation of dna single-strand breaks and reduces toxicity in u937 cells exposed to t-butylhydroperoxide. *Biochem J*, 317:371–375, 1996.
- [77] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 3. edition, 1999.
- [78] U. Hanson, B. Persson, and S. Thunell. Relationship between haemoglobin a<sub>1c</sub> in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformation in sweden. *Diabetologica*, 33:100–104, 1990.
- [79] R. J. Harris and L. Haas. Septo-optic dysplasia with growth hormone deficiency (de morsier syndrome). *Ach Dis Child*, 47:973–976, 1972.
- [80] N. Hattori, H. Suzuki, W. Yimin, S. Minoshima, N. Shimizu, H. Yoshino, R. Kurashima, M. Tanaka, T. Ozawa, and Y. Mizuno. Structural organization and chromosomal localization of the human nuclear gene (ndufv2) for the 24-kda iron-sulfur subunit of complex i in mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 216:771–777, 1995.
- [81] J Hayashi, S. Ohta, D. Takai, S. Miyavayashi, R. Sakuta, Y. Goto, and I. Nonaka. Accumulation of mtdna with a mutation at position 3271 in trna(leu)(uur) gene introduced from melas patient to hela cells lacking mtdna results in progressive inhibition of mitochondrial respiratory function. *Biochem Biophys Res Commun*, 197:1049–1055, 1993.
- [82] S. Hofmann, R. Bezold, M. Jaksch, P. Kaufhold, B. Obermaier-Kusser, and K.-D. Gerbitz. Disease relevance of the so-called secondary leber hereditary optic neuropathy mutations. *Am J Hum Genet*, 60:1539–1542, 1997.
- [83] I. J. Holt, A. E. Harding, and J. A. Morgan-Hughes. Deletions of muscle mitochondrial dna in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331:717–719, 1988.



- [84] M. Houshmand, E. Holme, C. Hanson, U.-B. Wennerholm, and L. Hamberger. Is paternal mitochondrial dna transferred to the offspring following intracytoplasmatic sperm injection? *J Ass Reprod Genet*, 14:223–227, 1997.
- [85] N. Howell, I. Kubacka, M. Xu, and D. A. McCullough. Leber hereditary optic neuropathy: Involvement of the mitochondrial nd1 gene and evidence for intragenic suppressor mutation. *Am J Hum Genet*, 48:935–942, 1991.
- [86] K. Huoponen, J. Vilkki, P. Aula, E. K. Nikoskelainen, and M. L. Savontaus. A new mtdna mutation associated with leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet*, 48:1147–1153, 1991.
- [87] L.D. Hurst and W.D. Hamilton. Cytoplasmic fusion and the nature of sexes. *Proc Roy Soc London Biol*, 247:189–194, 1992.
- [88] T. P. Hutchin, M. J. Parker, I. D. Young, A. C. Davis, L. J. Pulleyn, J. Deeble, N. J. Lench, A. F. Markham, and R. F. Mueller. A novel mutation in the mitochondrial trna<sup>Ser(UCN)</sup> gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet*, 37:692–694, 2000.
- [89] M. Jaksch, S. Hofmann, S. Kleinle, S. Liechti-Gallati, D. E. Pongratz, J. Mller-Hcker, K. B. Jedele, T. Meitinger, and K. D. Gerbitz. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (cox) deficiency shows trna<sup>Ser(UCN)</sup> mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *J Med Genet*, 35:895–900, 1998.
- [90] M. Jaksch, T. Klopstock, G. Kurlemann, M. Drner, S. Hofmann, S. Kleinle, S. Hegemann, M. Weissert, J. Mller-Hcker, D. Pongratz, and K. D. Gerbitz. Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the trna<sup>Ser(UCN)</sup> gene. *Ann Neurol*, 44:635–640, 1998.
- [91] K. Jellinger and F. Seitelberger. Die subakute nekrotisierende enzephalomyopathie (leigh). *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*, 29:155–219, 1970.
- [92] J. P. Jenuth, A.C. Peterson, K. Fu, and E. A. Shoubridge. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial dna. *Nat Genet*, 14:146–151, 1996.
- [93] D. R. Johns and M. J. Neufeld. Cytochrome b mutations in leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 181:1358–1364, 1991.

- [94] D. R. Johns, M. J. Neufeld, and R. D. Park. An nd6 mitochondrial dna mutation associated with leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 187:1551–1557, 1992.
- [95] K. R. Johnson, Q Yin Zheng, Y Bykhovskaya, O. Spirina, and N. Fischel-Ghodsian. A nuclear-mitochondrial dna interaction affecting hearing impairment in mice. *Nat Genet*, 27:191–194, 2001.
- [96] B. Kadenbach, A. Stroh, F. J. Huther, A. Reimann, and D. Steverding. Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*, 23:321–334, 1991.
- [97] M. M. Kanter. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc*, 57:9–13, 1998.
- [98] C. L. Karadimas, P. Greenstein, C. M. Sue, J. T. Joseph, K. Tanij, R. G. Haller, T. Taivassalo, M. M. Davidson, S. Shanske, E. Bonilla, and S. DiMauro. Recurrent myoglobinuria due to a nonsense mutation in the *cox i* gene of mitochondrial dna. *Neurology*, 55:644–649, 2000.
- [99] T. P. Kearns and G. P. Sayre. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *Arch Ophthalmol*, 60:280–289, 1958.
- [100] J. A. Keightley, R. Anitori, M. D. Burton, F. Quan, N. R. M. Buist, and N. G. Kennaway. Mitochondrial encephalomyopathy and complex iii deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome b gene. *Am J Hum Genet*, 67:1400–1410, 2000.
- [101] J. A. Keightley, K. C. Hoffbuhr, M. D. Burton, V. M. Salas, W. S. W. Johnston, A. M. W. Penn, N. R. M. Buist, and N. G. Kennaway. A microdeletion in cytochrome c oxidase (cox) subunit iii associated with cox deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet*, 12:410–416, 1996.
- [102] D. Keilin and E. F. Hartee. Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proc Roy Soc London Biol*, 127:167–191, 1939.
- [103] N. G. Kennaway. Defects in the cytochrome bc1 complex in mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr*, 20:325–352, 1988.

- [104] E. P. Kennedy and A. L. Lehninger. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 179:957–960, 1949.
- [105] R. Kffner, A. Rohr, A. Schmiede, C. Krll, and U. Schulte. Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase (complex i). *J Mol Biol*, 283:409–417, 1998.
- [106] M. P. King. Use of ethidium bromide to manipulate ratio of mutated and wild type mitochondrial dna in cultured cells. *Methods in Enzymology*, 264:339–344, 1996.
- [107] M. P. King and G. Attardi. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial dna. *Methods in Enzymology*, 264:304–313, 1996.
- [108] M. P. King and G. Attardi. Mitochondria-mediated transformation of human  $\rho^0$  cells. *Methods in Enzymology*, 264:313–334, 1996.
- [109] K. Kinoshita, R. Yasuda, H. Noji, S. Ishiwata, and M. Yoshida. F1-atpase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell*, 93:21–24, 1998.
- [110] J. Klose. Large-gel 2-d electrophoresis. In A. J. Link, editor, *2-D proteome analysis protocols.*, volume 112 of *Methods in molecular biology.*, chapter 16, pages 147–172. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999.
- [111] R. Knee and P. R. Murphy. Regulation of gene expression by natural antisense rna transcripts. *Neurochem Int*, 31:379–392, 1997.
- [112] M. Kozak. Point mutations define a sequence flanking the aug initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44:283–292, 1986.
- [113] H. A. Krebs and W. A. Johnson. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologica*, 4:158–156, 1937.
- [114] C. Y. Kuan, K. A. Roth, R. A. Falvell, and P. Rakic. Mechanism of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci*, 23:291–297, 2000.
- [115] N.-G. Larsson, J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandowski, G. S. Barsh, and D. A. Clayton. Mitochondrial transcription factor a is necessary for mtdna maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, 18:231–236, 1998.

- [116] T. Leber. ber hereditre und kongenital angelegte sehnervenleiden. *Grfes Arch Ophthal*, 17:249–291, 1871.
- [117] D. Leigh. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 14:216–221, 1951.
- [118] J. V. Leonard and A. H. V. Schapira. Mitochondrial respiratory chain disorders i: mitochondrial dna defects. *Lancet*, 355:299–304, 2000.
- [119] J. V. Leonard and A. H. V. Schapira. Mitochondrial respiratory chain disorders ii: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet*, 355:389–394, 2000.
- [120] P. Lestienne and G. Ponsot. Kearns–sayre syndrome with muscle mitochondrial dna deletion. *Lancet*, 8590:885, 1988.
- [121] A. S. Leveille and F. W. Newell. Autosomal dominant kearns–sayre syndrome. *Ophthalmology*, 87:99–108, 1980.
- [122] Y. Y. Li, C. Hengstenberg, and B. Maisch. Whole mitochondrial genome amplification reveals basal level multiple deletions in mtdna of patients with dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 210:211–218, 1995.
- [123] M. H. Liang and L. J. C. Wong. Yield of mtdna mutation analysis in 2000 patients. *Am J Med Genet*, 77:395–400, 1998.
- [124] J. Loeffen, R. Smeets, J. Smeitink, W. Ruitenbeek, A. Janssen, E. Mariman, R. Sengers, F. Trijbels, and L. van den Heuvel. The x–chromosomal ndufa1 gene of complex i in mitochondrial encephalomyopathies: tissue expression and mutation detection. *J Inher Metab Dis*, 21:210–215, 1998.
- [125] J. Loeffen, R. Smeets, J. Smeitink, R. Triepels, R. Sengers, F. Trijbels, and L. van den Heuvel. The human nadh: ubiquinone oxidoreductase ndufs5 (15kda) subunit: cDNA cloning, chromosomal localization, tissue distribution and the absence of mutations in isolated complex i–deficient patients. *J Inher Metab Dis*, 22:19–28, 1999.
- [126] J. Loeffen, J. Smeitink, R. Triepels, R. Smeets, M. Schuelke, R. Sengers, F. Trijbels, B. Hamel, R. Mulaart, and L. van den Heuvel. The first nuclear–encoded complex i mutation in a patient with leigh syndrome. *Am J Hum Genet*, 63:1598–1608, 1998.

- [127] C. M. Luetjens, N. T. Bui, B. Sengspiel, g. Mnstermann, M. Poppe, A. J. Krohn, E. Bauerbach, J. Kriegelstein, and J. H. M. Prehn. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrom c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci*, 20:5715–5723, 2000.
- [128] A. D. Luster, R. L. Weinshank, R. Feinman, and J. V. Ravetch. Molecular and biochemical characterization of a novel  $\gamma$ -interferon-inducible protein. *J Biol Chem*, 263:12036–12043, 1988.
- [129] D. A. Mackey, R.-J. Ostra, T. Rosenberg, E. Nikoskelainen, J. Bronte-Stewart, J. Poulton, A. E. Harding, G. Govan, P. A. Bolhuis, S. Norby, E. M. Bleeker-Wagemakers, M.-L. Savontaus, C. Chan, and Howell. Primary pathogenic mtdna mutations in multigeneration pedigrees with leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet*, 59:481–485, 1996.
- [130] G Manfredi, D. Thyagarajan, L. C. Papadopoulou, F. Pallotti, and E. A. Schon. The fate of human sperm-derived mtdna in somatic cells. *Am J Hum Genet*, 61:953–960, 1997.
- [131] M. Markwell. A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*, 87:206–210, 1978.
- [132] M. A. McShane, S. R. Hammans, M. Sweeney, I. J. Holt, T J. Beattie, E. M. Brett, and A. E. Harding. Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtdna. *Am J Hum Genet*, 48:39–42, 1991.
- [133] S. A. Miller, D. D. Dykes, and H. F. Polesky. A simple salting out procedure for extracting dna from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16:1215, 1988.
- [134] J. M. Milunski and S. M. Cheney. Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by direct molecular analysis: efficacy and potential pitfalls. *Genet Test*, 3:255–258, 1999.
- [135] O. Miro and J. Grav, J. M. Casademont. Mitochondrial disease in patients with exercise intolerance [letters to the editor]. *N Engl J Med*, 342:438–440, 2000.
- [136] P. Mitchell. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191:144–148, 1961.

- [137] A. A. M. Morris, J. V. Leonard, G. K. Brown, S. K. Bidouki, L. A. Bindoff, C. E. Woodward, A. E. Harding, B. D. Lake, B. N. Harding, M. A. Farrell, J. E. Bell, M. Mirakhur, and D. M. Turnbull. Deficiency of respiratory chain complex i is a common cause of leigh disease. *Ann Neurol*, 40:25–30, 1996.
- [138] J. Mourmans, U. Wendel, H. A. Bentlage, J. M. Trijbels, J. Smeitink, I. F. de Coo, F. J. Gabreels, R. C. Sengers, and W. Ruitenbeek. Clinical heterogeneity in respiratory chain complex iii deficiency in childhood. *J Neurol Sci*, 149:111–117, 1997.
- [139] D. Mowat, D. M. Kirby, K. R. Kamath, A. Klan, D. R. Thorburn, and J. Christodoulou. Respiratory chain complex iii deficiency with pruritus: a novel vitamin responsive clinical feature. *J Pediatr*, 134:352–354, 1999.
- [140] P. R. Mueller and B. Wold. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated pcr. *Science*, 246:780–786, 1989.
- [141] M. Nakamura, S. Nakano, Y. Goto, M. Ozawa, Y. Nagahama, H. Fukuyama, I. Akiguchi, R. Kaji, and J. Kimura. A novel point mutation in the mitochondrial trna<sup>Ser(UCN)</sup> gene detected in a family with merrf/melas overlap syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 214:86–93, 1995.
- [142] M. M. Nass and S. Nass. Intramitochondrial fibers with dna characteristics. i. fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol*, 19:593–611, 1963.
- [143] R.K. Naviaux, W.L. Nyhan, B.A. Barshop, J. Poulton, D. Markusic, N.C. Karpinski, and R.H. Haas. Mitochondrial dna polymerase  $\gamma$  deficiency and mtdna depletion in a child with alpers' syndrome. *Ann Neurol*, 45:54–58, 1999.
- [144] C. W. Olanow and W. G. Tatton. Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 22:123–144, 1999.
- [145] R.-J. Oostra, P. A. Bolhuis, I. Zorn-Ende, M. M. de Kok-Nazaruk, and E. M. Bleeker-Wagemakers. Leber's hereditary optic neuropathy: no significant evidence for primary or secondary pathogenicity of the 15257 mutation. *Hum Genet*, 94:265–270, 1994.
- [146] R. W. Oppenheim. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14:453–501, 1991.

- [147] G. E. Palade. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem*, 1:188–211, 1953.
- [148] L. C. Papadopoulou, C. M. Sue, M. M. Davidson, K. Tanji, I. Nishino, J. E. Sadellock, S. Krishna, W. Walker, J. Selby, D. M. Glerum, R. van Coster, G. Lyon, E. Scalais, R. Lebel, P. Kaplan, and Shansk. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with cox deficiency and mutations in *sco2*, a cox assembly gene. *Nat Genet*, 23:333–337, 1999.
- [149] W. D. Parker and R. H. Swerdlow. Mitochondrial dysfunction in idiopathic parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 62:758–762, 1998.
- [150] D. S. Patel, R. Aebersold, and G. Attardi. cDNA-derived amino acid sequence of the nadh-binding 51-kDa subunit of the bovine respiratory nadh dehydrogenase reveals striking similarities to a bacterial nad<sup>+</sup>-reducing hydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4225–4229, 1991.
- [151] M. S. Patel and R. A. Harris. Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects. *FASEB J*, 9:1164–1172, 1995.
- [152] H. A. Pearson, J. S. Lobel, S. A. Kocoshis, J. L. Naiman, J. Windmiller, A. T. Lammi, R. Hoffman, and J. C. Marsh. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr*, 95:976–984, 1979.
- [153] L. Piko and K. D. Taylor. Amounts of mitochondrial dna and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol*, 123:364–374, 1987.
- [154] S. J. Pilkington, J. M. Skehel, R. B. Gennis, and J. E. Walker. Relationship between mitochondrial nadh-ubiquinone reductase and a bacterial nad-reducing hydrogenase. *Biochemistry*, 30:2166–2175, 1991.
- [155] S. Rahman, R. B. Blok, H. H. Dahl, D. M. Danks, Kirby D. M., C. W. Chow, J. Christodoulou, and D. R. Thorburn. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and dna abnormalities. *Ann Neurol*, 39:343–351, 1996.
- [156] M. Rana, I. de Coo, F. Diaz, H. Smeets, and C. T. Moraes. An out-of-frame cytochrome b gene deletion from a patient with parkinsonism is associated with



- impaired complex iii assembly and an increase in free radical production. *Ann Neurol*, 48:774–781, 2000.
- [157] T. Ravingerova, J. Slezak, N. Tribulova, B. Uhrik, and A. Ziegelhoffer. Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion–induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci*, 65:1927–1930, 1999.
- [158] F. M. Reid, A. Rovio, I. J. Holt, and H. T. Jacobs. Molecular phenotype of human lymphoblastoid cell–line homoplasmic for the np 7445 deafness–associated mitochondrial mutation. *Hum Mol Genet*, 6:443–449, 1997.
- [159] F. M. Reid, G. A. Vernham, and H. T. Jacobs. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat*, 3:243–247, 1994.
- [160] B. H. Robinson, H. MacMillan, R. Petrova-Benedict, and W. G. Sherwood. Variable clinical presentation in patients with defective e1 component of pyruvate dehydrogenase complex. *J Pediatr*, 111:525–533, 1987.
- [161] A. Rtig, V. Cormier, S. Blanche, J. P. Bonnefort, F. Ledeist, N. Romero, J. Schmitz, P. Rustin, A. Fischer, J. M. Saudubray, and A. Munnich. Pearson’s marrow–pancreas syndrome: a multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest*, 86:1601–1608, 1990.
- [162] W. Ruitenbeek, R. C. A. Sengers, J. F. M. Trijbels, A. J. Janssen, and J. A. Bakkeren. The use of chorionic villi in prenatal diagnosis of mitochondriopathies. *J Inherit Metab Dis*, 15:303–306, 1992.
- [163] P. Rustin, J. C. Kleist-Retzow, K. Chantrel-Groussard, D. Sidi, and A. Munnich. Effect of idebenone on cardiomyopathy in friedreich’s ataxia: a preliminary study. *Lancet*, 354:477–79, 1999.
- [164] S. Scacco, R. Vergari, R. C. Scarpulla, Z. Technikova-Dobrova, Sardanelli A., Lambo R., and Papa S. Lorusso V. camp–dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18–kda (ip) subunit of respiratory complex i and activation of the complex in serum–starved fibroblast mouse cultures. *J Biol Chem*, 275:17578–17582, 2000.
- [165] M. Schleyer and W. Neupert. Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membrane. *Cell*, 43:339–350, 1985.

- [166] E. A. Schon. Mitochondrial genetics and disease. *TIBS*, 25:555–560, 2000.
- [167] E. A. Schon, Y. Koga, M. Davidson, C. T. Moraes, and M. P. King. The mitochondrial trna(Leu)(UUR) mutation in melas: a model for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1101:206–209, 1992.
- [168] M. Schuelke. An economic method for the fluorescence labeling of pcr fragments. a poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nat Biotech*, 18:233–234, 2000.
- [169] M. Schuelke, J. Loeffen, E. Mariman, J. Smeitink, and L. van den Heuvel. Cloning of the human mitochondrial 51 kda subunit (ndufv1) reveals a 100% anti-sense homology of its 3'utr with the 5'utr of the  $\gamma$ -interferon inducible protein (ip-30) precursor: is this a link between mitochondrial myopathy and inflammation? *Biochem Biophys Res Commun*, 245:599–606, 1998.
- [170] M. Schuelke, J. Smeitink, E. Mariman, J. Loeffen, B. Plecko, F. Trijbels, S. Stckler-Ipsiroglu, and L. van den Heuvel. Mutant ndufv1 subunit of mitochondrial complex i causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet*, 21:260–261, 1999.
- [171] U. Schulte, V. Haupt, A. Abelmann, W. Fecke, B. Brors, T. Rasmussen, T. Friedrich, and H. Weiss. A reductase/isomerase subunit of mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase (complex i) carries an nadph and is involved in the biogenesis of the complex. *J Mol Biol*, 292:569–580, 1999.
- [172] R. S. Seelan and L. I. Grossman. Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit viic gene. *J Biol Chem*, 272:10175–10181, 1997.
- [173] A. H. Shapira. Mitochondrial involvement in parkinson's disease, huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta*, 1410:159–170, 2000.
- [174] J. M. Shoffner, M. T. Lott, A. M. S. Lezza, P. Seibel, S. W. Ballinger, and D. C. Wallace. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (merrf) is associated with a mitochondrial dna trna<sup>Lys</sup> mutation. *Cell*, 61:931–937, 1990.
- [175] E. A. Shoubridge. Mitochondrial dna diseases: histological and cellular studies. *J Bioenerg Biomembr*, 26:301–310, 1994.

- [176] G Silvestri, C. T. Moraes, S. Shanske, S. J. Oh, and S. DiMauro. A new mtdna mutation in the trnals gene associated with myoclonic epilepsy and ragged red fibers (merrf). *Am J Hum Genet*, 51:1213–1217, 1992.
- [177] C. M. Siman and U. J. Eriksson. Vitamin c supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia*, 40:1416–1424, 1997.
- [178] H. J. Simonsz, K. Barlocher, and A. Rtig. Kearns–sayre’s syndrome developing in a boy who survived pearson’s syndrome caused by mitochondrial dna deletion. *Doc Ophthalmol*, 82:73–79, 1992.
- [179] J. A. M. Smeitink, J. L. C. M. Loeffen, R. H. Triepels, R. J. P. Smeets, J. M. F. Trijbels, and L. P. van den Heuvel. Nuclear genes of human complex i of the mitochondrial electron transport chain: state of the art. *Hum Mol Genet*, 7:1573–1579, 1998.
- [180] N. W. Smirnow and I. W. Dunin-Barkowski. *Mathematische Statistik in der Technik.*, volume 9 of *Mathematik fr Naturwissenschaft und Technik*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 3 edition, 1977.
- [181] C. Sobreira, M. Hirano, S. Shanske, R. K. Keller, R. G. Haller, E. Davidson, F. M. Santorelli, A. F. Miranda, E. Bonilla, D. s. Mojon, A. A. Barreira, M. P. King, and S. DiMauro. Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme q<sub>10</sub> deficiency. *Neurology*, 48:1238–1243, 1997.
- [182] V. V. Solovyev, A. A. Salamov, and C. B. Lawrence. Predicting internal exons by oligonucleotide composition and discriminant analysis of spliceable open reading frames. *Nucleic Acids Res*, 22:5156–5163, 1995.
- [183] S. R. Spencer, J. B. Taylor, I. G. Cowell, C.-L. Xia, S. E. Pemble, and B. Ketterer. The human mitochondrial nadh:ubiquinone oxidoreductase 51–kda subunit maps adjacent to the glutathione s–transferase p1–1 gene on chromosome 11q13. *Genomics*, 14:1116–1118, 1992.
- [184] C. M. Sue, D. S. Crimmins, Y. S. Soo, R. Pamphlett, C. M. Presgrave, N. Kotsimbos, M. J. B. Jean-Francois, E. Byrne, and J. G. L. Morris. Neuroradiological features of six kindreds with melas trna<sup>Leu</sup> a3243g point mutation: implications for pathogenesis. *J Neurol Neurosurg Psych*, 65:233–240, 1998.

- [185] K. Sundberg, C. Lundsteen, and J. Philip. Comparison of cell cultures, chromosome quality and karyotypes obtained after chorionic villus sampling and early amniocentesis with filter technique. *Prenat Diagn*, 19:12–16, 1999.
- [186] S. Takahashi, Y. Makita, J. Oki, A. Miyamoto, J. Yanagawa, E. Naito, Y. I. Goto, and A. Okuno. De novo mtdna nt 8993 (t→g) mutation resulting in leigh syndrome. *Am J Hum Genet*, 62:717–719, 1998.
- [187] R. Thermann, G. Neu-Yilik, A. Deters, U. Frede, K. Wehr, C. Hagemeyer, M. W. Hentze, and A. E. Kulozik. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J*, 17:3484–3494, 1998.
- [188] P. Q. Thomas, M. T. Dattani, J. M. Brickmann, D. McNay, G. Warne, M. Zacharin, F. Cameron, J. Hurst, K. Woods, D. Dunger, R. Stanhope, S. Forrest, C. A. F. Robinson, and R. S. P. Beddington. Heterozygous *hesx1* mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and spto–optic dysplasia. *Hum Mol Genet*, 10:39–45, 2001.
- [189] P. M. Tiidus. Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol*, 76:533–538, 1998.
- [190] V. Tiranti, P. Chariot, F. Carella, A. Toscano, P. Soliveri, P. Girlanda, F. Carrara, G. M. Fratta, F.M. Reid, C. Mariotti, and M. Zeviani. Maternally inherited hearing loss, ataxia and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial trna<sup>Ser(UCN)</sup> gene. *Hum Mol Genet*, 4:1421–1427, 1995.
- [191] V. Tiranti, K. Hoernagel, R. Carrozzo, C. Galimberti, M. Munaro, M. Granatiero, L. Zelante, P. Gasparini, R. Marzella, M. Rocchi, M. P. Bayona-Bafaluy, J. A. Enriquez, G. Uziel, E. Bertini, and Dionisi. Mutations of surf–1 in leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet*, 63:1609–1621, 1998.
- [192] A. Toscano, M. C. Fazio, G. Vita, S. Cannavo, N. Bresolin, L. Bret, A. Prella, B. Barbiroli, S. Iotti, P. Zaniol, A. Magaudo, F. Trimarchi, and C. Messina. Early-onset cerebellar ataxia, myoclonus and hypogonadism in a case of mitochondrial complex iii deficiency treated with vitamins k<sub>3</sub> and c. *J Neurol*, 242:203–209, 1995.

- [193] R. Triepels, J. Smeitink, J. Loeffen, R. Smeets, C. Buskens, F. Trijbels, and L. van den Heuvel. The human nuclear-encoded acyl carrier subunit (*ndufab1*) of the mitochondrial complex i in human pathology. *J Inherit Metab Dis*, 22:163–173, 1999.
- [194] R. Triepels, J. Smeitink, R. Smeets, F. Trijbels, and L. van den Heuvel. Characterization of the human complex i *ndufb7* and 17.2-kda cdnas and mutational analysis of 19 genes of the hp fraction in complex i-deficient-patients. *Hum Genet*, 106:385–391, 2000.
- [195] R. Triepels, L. van den Heuvel, J. Loeffen, R. Smeets, F. Trijbels, and J. Smeitink. The nuclear-encoded human nadh:ubiquinone oxidoreductase *ndufa8* subunit cDNA cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and mutation detection in complex i-deficient patients. *Hum Genet*, 103:557–563, 1998.
- [196] R. H. Triepels, L. P. van den Heuvel, J. L. C. M. Loeffen, C. A. F. Buskens, R. J. P. Smeets, M. E. Rubio Gozalbo, S. M. S. Budde, E. C. Mariman, F. A. Wijburg, P. G. Barth, J. M. F. Trijbels, and J. A. M. Smeitink. Leigh syndrome associated with a mutation in the *ndufs7* (*psst*) nuclear encoded subunit of complex i. *Ann Neurol*, 45:787–790, 1999.
- [197] J. M. F. Trijbels, R. C. A. Sengers, W. Ruitenbeek, J. C. Fischer, J. A. J. M. Bakkeren, and A. J. M. Janssen. Disorders of the mitochondrial respiratory chain: clinical manifestations and diagnostic approach. *Eur J Pediatr*, 148:92–97, 1988.
- [198] I. A. Trounce, Y. L. Kim, A. S. Jun, and D. C. Wallace. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. In G. A. Attardi and A. Chomyn, editors, *Mitochondrial biogenesis and genetics.*, volume 264 of *Methods Enzymol*, pages 484–509. Academic Press, San Diego, 1996.
- [199] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 269:1069–1074, 1995.
- [200] T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa. The whole

- structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272:1136–1144, 1996.
- [201] J. Uusimaa, A. M. Remes, H. Rantala, L. Vainionp, R. Herva, K. Vuopala, M. Nuutinen, K. Majamaa, and I. E. Hassinen. Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics*, 105:598–603, 2000.
- [202] I. Valnot, J. Kassis, D. Chretien, P. de Lonlay, B. Parfait, A. Munnich, J. Kachaner, P. Rustin, and A. Rtig. A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex iii) deficiency. *Hum Genet*, 104:460–466, 1999.
- [203] I. Valnot, J. C. Kleist-Retzow, A. Barrientos, M. Gorbatyuk, J. W. Taanman, B. Mehaye, P. Rustin, A. tzagoloff, A. Munnich, and A. Rtig. A mutation in the human heme a:farnesyltransferase gene (cox10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet*, 9:1245–1249, 2000.
- [204] L. van den Heuvel, W. Ruitenbeek, R. Smeets, Z. Gelman-Kohan, O. Elpeleg, J. Loeffen, F. Trijbels, E. Mariman, D. de Bruijn, and J. Smeitink. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex i deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kd (aqdq) subunit. *Am J Hum Genet*, 62:262–268, 1998.
- [205] K. Verhoeven, R. J. H. Ensink, V. Tiranti, P. L. M. Huygen, D. Johnson, I. S. Schattemann, L. van Laer, M. Verstreken, P. van de Heyning, N. Fischel-Ghodsian, M. Zeviani, C. W. R. J. Cremers, and P. Willems. Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial trnase(ucn) gene. *Eur J Hum Genet*, 7:45–51, 1999.
- [206] L. Vigilant, M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes, and A. C. Wilson. African populations and the evolution of human mitochondrial dna. *Science*, 253:1503–1507, 1991.
- [207] J. V. Virbasius and R. C. Scarpulla. Activation of the human mitochondrial transcription factor a gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:1309–1313, 1994.

- [208] J. V. Virbasius, C. A. Virbasius, and R. C. Scarpulla. Identity of gabp with nrf-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ets domain activator of viral promoters. *Genes Dev*, 7:380–392, 1993.
- [209] I. Vyas, R. E. Heikkila, and W. J. Nicklas. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine: inhibition of nad-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-pyridinium. *J Neurochem*, 46:1501–1507, 1986.
- [210] J. E. Walker. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1271:221–227, 1995.
- [211] J. E. Walker, J. M. Arizmendi, A. Dupuis, I. M. Fearnley, M. Finel, S. M. Medd, S. J. Pilkington, M. J. Runswick, and J. M. Skehel. Sequences of 20 subunits of nadh:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction. *J Mol Biol*, 226:1051–1072, 1992.
- [212] D. C. Wallace, G. Singh, M. T. Lott, J. A. Hodge, T. G. Schurr, A. M. Lezza, L. J. Elsas, and E. K. Nikoskelainen. Mitochondrial dna mutation associated with leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242:1427–1430, 1988.
- [213] B. Wan and R. W. Moreadith. Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase via. *J Biol Chem*, 270:26433–26440, 1995.
- [214] K. Weber, J. N. Wilson, L. Taylor, E. Brierley, M. A. Johnson, D. M. Turnbull, and L. A. Bindoff. A new mtdna mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet*, 60:373–380, 1997.
- [215] U. Weidner, S. Geier, A. Ptock, T. Friedrich, H. Leif, and H. Weiss. The gene locus of the proton-translocating nadh:ubiquinone oxidoreductase in escherichia coli. organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex i. *J Mol Biol*, 233:109–122, 1993.
- [216] S. L. White, V. R. Collins, R. Wolfe, M. A. Cleary, S. Shanske, S. DiMauro, H. H. M. Dahl, and D. R. Thorburn. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial dna mutations at nucleotide 8993. *Am J Hum Genet*, 65:474–482, 1999.



- [217] S. L. White, S. Shanske, J. J. McGill, H. Mountain, M. T. Geraghty, S. DiMauro, H. H. Dahl, and D. R. Thorburn. Mitochondrial dna mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue- or age related variation. *J Inherit Metab Dis*, 22:899–914, 1999.
- [218] R. K. Wierenga, P. Terpstra, and W. G. Hol. Prediction of the occurrence of adp-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol*, 187:101–107, 1986.
- [219] S. Willnow, W. Kiess, O. Butenandt, H. G. Dorr, A. Enders, B. Straser-vogel, J. Egger, and H. P. Schwartz. Endocrine disorders in spto-optic dysplasia (de morsier syndrome) – evaluation and follow up of 18 patients. *Eur J Pediatr*, 155:179–184, 1996.
- [220] I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. S. Campbell. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810–813, 1997.
- [221] D. Xia, C A. Yu, H. Kim, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu, and J. Deisenhofer. Crystal structure of the cytochrome  $bc_1$  complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277:60–66, 1997.
- [222] X. Yang, L. A. Borg, and U. J. Eriksson. Altered metabolism and superoxide generation in neural tissue of rat embryos exposed to high glucose. *Am J Physiol*, 272:E173–180, 1997.
- [223] M. Yoneda, A. Chomyn, A. Martinuzzi, O. Hurko, and G. Attardi. Marked replicative advantage of human mtdna carrying a point mutation that causes the melas encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:11164–11168, 1992.
- [224] C. A. Yu, L. Zhang, K. P. Deng, H. Tian, D. Xia, H. Kim, J. Deisenhofer, and L. Yu. Structure and reaction mechanisms of multifunctional mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex. *BioFactors*, 9:103–109, 1999.
- [225] Z. Zhang, L. Huang, V.M. Shulmeister, Y.-I. Chi, K.K. Kim, L.-W. Hung, A.R. Crofts, E.A. Berry, and S.-H. Kim. Electron transfer by domain movement in cytochrome  $bc_1$ . *Nature*, 392:677–684, 1998.
- [226] Z. Zhu, J. Yoa, T. Johns, K. Fu, I. de Bie, C. Macmillan, A. P. Cuthbert, R. F. Newbold, J. Wang, M. Chevrette, G. K. Brown, R. M. Brown, and E. A. Shou-

bridge. Surf1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in leigh syndrome. *Nat Genet*, 20:337–343, 1998.

- [227] J. Zielasek, H. Reichmann, H. Kunzig, S. Jung, H. P. Hartung, and K. V. Toyka. Inhibition of brain macrophage/microglial respiratory chain activity in experimental autoimmune encephalomyelitis of the lewis rat. *Neurosci Lett*, 184:129–132, 1995.

# **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfaßt zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Dr. med. Markus Schülke – Gerstenfeld  
Berlin, den 10. März 2001

# Lebenslauf

Geboren am 05.07.1962 in Bleicherode/Harz,

Vater: Dr. rer. nat. W. Schülke, Physiker,

Mutter: Dr. med. dent. S. Schülke (geb. Hoffmann), Zahnärztin.

|             |   |
|-------------|---|
| 1982–1989   | Studium der Humanmedizin in Homburg (Saar), Berlin, Dublin (Irland) und Hong Kong, 3. Staatsexamen mit im August 1989   |
| 1983–1989   | Stipendiat der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“   |
| 1991        | Promotion mit dem Thema „Morphometrische Untersuchungen an unbemerkten Nervenfasern bei Kindern mit spätingfantiler Ceroidlipofuscinose“ Betreuer: Prof. Dr. J. Cervós-Navarro, Institut für Neuropathologie, FU-Berlin |
| 1990-1992   | Arzt im Praktikum und Assistenzarzt an der Universitätskinderklinik zu Köln (Direktor: Prof. Dr. P. Michalk)  |
| 1992        | Arbeit in einem WHO-Entwicklungshilfeprojekt „Viklang Kendra“ (Allahabad, Indien) zur neurologischen und orthopädischen Rehabilitation von Poliopatien.   |
| seit 1993   | Assistenzarzt an der Abteilung Neuropädiatrie am Kaiserin–Auguste–Viktoria–Haus (Direktor: Prof. Dr. D. Scheffner) und später am Virchow-Klinikum (Direktor: Prof. Dr. C. Hübner)                                       |
| 1997-1999   | DFG-Forschungsstipendium am „Nijmegen Center for Mitochondrial Diseases“ in den Niederlanden, Betreuer: Prof. Dr. F. Trijbels und Dr. J. Smeitink.  |
| 1/1999      | Erwerb der Teilgebetsbezeichnung „Facharzt für Kinderheilkunde“   |
| 4/1999      | Rückkehr an die Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie, Arbeitsgruppenleiter des molekulargenetischen Labors.  |
| seit 7/2000 | Oberarzt an der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der Charité (Direktor: Prof. Dr. C. Hübner)   |